

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Sille Hausenberg

YbeY valgu toimemehhanismist rRNA ja ribosoomide metabolismis *Escherichia coli*'s

Magistritöö

30 EAP

Juhendajad

teadur Ülo Maiväli, PhD

vanemteadur Arvi Jõers, PhD

TARTU 2016

YbeY valgu toimemehhanismist rRNA ja ribosoomide metabolismis *Escherichia coli*'s

YbeY on *Escherichia coli* endoribonukleas ja kuumašoki valk. Selle osalust on näidatud 16S rRNA protsessimisel, ribosoomide kvaliteedikontrollis ja ribosoomide lagundamisel. On püstitatud hüpotees, et YbeY endoribonukleasne aktiivsus pole kõigis nendes protsessides osalemiseks vajalik. Oma töös olen uurinud kahe ensümaatilisel inaktiivse YbeY mutandi fenotüüpe erinevates tingimustes. Üks neist, YbeY-R59A, kutsub esile fenotüübi, mis vastab metsiktüüpi YbeY valgu fenotüübile. Näib, et vähemalt teatud protsessides ei pea YbeY oma funktsiooni täitmiseks endoribonukleasset aktiivsust omama. Samas aga meenutab YbeY-H114A mutanti sisaldava tüve fenotüüp $\Delta ybeY$ tüve oma. Need tulemused viitavad võimalusele, et YbeY võib erinevates ribosoomide biogeneesi ja lagundamisega seotud protsessides erinevalt funktsioneerida. Olen selles töös esitanud mudeli, mis võib seletada aminohappejääkide R59 ja H114 rolli YbeY valgus. YbeY täpse toimemehhanismi välja selgitamiseks rRNA ja ribosoomide metabolismis on vaja veel tööd teha.

Märksõnad: YbeY, rRNA protsessimine, ribosoomide lagundamine, ribosoomid, CPEC
CERCS kood: P310 – Proteiinid, ensüümid; B230 – Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

On the Mechanism of Action of YbeY in rRNA and Ribosome Metabolism in *Escherichia coli*

YbeY is an endoribonuclease and a heat-shock protein in *Escherichia coli*. It has been reported to be involved in 16S rRNA processing, ribosome quality control and ribosome degradation. However, it might not act as an endoribonuclease in all of these processes. We have examined the phenotypes of two enzymatically inactive YbeY mutants to address this hypothesis. We have found that one of them, YbeY-R59A, acts like the wild-type YbeY protein, suggesting that in at least some processes YbeY does not need its catalytic activity to function properly. YbeY-H114A mutant's phenotype, on the other hand, resembles that of $\Delta ybeY$ strain. These results indicate that YbeY might have different functions in different ribosome biogenesis and degradation related processes. A model for the roles of R59 and H114 in YbeY is proposed. However, more research needs to be conducted to elucidate the exact role of YbeY in rRNA and ribosome metabolism.

Keywords: YbeY, rRNA processing, ribosome degradation, ribosomes, CPEC
CERCS code: P310 – Proteins, enzymology; B230 – Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Ribosoomid <i>Escherichia coli</i> 's.....	7
1.2. Translatsioon <i>Escherichia coli</i> 's	7
1.3. Ribosoomide süntees <i>Escherichia coli</i> 's	8
1.3.1. rRNA protsessimine	8
1.3.2. Ribosoomide kokkupanek	12
1.4. Ribosoomide ja rRNA lagundamine <i>Escherichia coli</i> 's	14
1.4.1. rRNA protsessimise ja ribosoomide kokkupaneku vead	14
1.4.2. Küpsed ribosoomid.....	16
1.4.3. Ribosoomide lagundamise põhjused	16
1.5. YbeY.....	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	22
2.2.1. Bakteritüved, oligonukleotiidid ja söötmed.....	22
2.2.2. Komplementatsiooniplasmiidide konstrueerimine	22
2.2.3. Kanamütsiini markeri eemaldamine $\Delta ybeY$ tüvest	25
2.2.4. Kasvukõverate ja –parameetrite mõõtmine	26
2.2.5. Ribosomaalse RNA lagundamise uurimise katsesüsteem	27
2.2.6. Ribosomaalse RNA ettevalmistamine <i>Northern blot</i> 'i jaoks	28
2.2.7. <i>Northern blot</i>	29
2.2.7.1. Gelelektroforees.....	29
2.2.7.2. RNA ülekanne membraanile	30
2.2.7.3. Hübridisatsioon.....	30
2.2.7.4. Membraani pesu	30
2.2.8. Signaali detektsioon.....	31
2.2.9. Membraani puhastamine oligonukleotiididest	31
2.2.10. WT ja $\Delta ybeY$ tüvede kasvukiiruste ühtlustamine	31
2.3. Tulemused	33
2.3.1. pET-YbeY komplementatsiooniks piisab 100 μ M IPTG induktsioonist	34
2.3.2. YbeY mutandid komplementeerivad kasvudefekte erinevalt.....	35
2.3.3. $\Delta ybeY$ translatsiooni ja ribosoomide kokkupaneku defektid ei sõltu kasvukiirusest	37

2.3.4. YbeY mutantide rRNA ja ribosoomide profiilid erinevad CAM stressis	39
2.3.5. YbeY mutantide rRNA protsessimine ja ribosoomiprofiilid erinevad kuumastressis	44
2.4. Arutelu	47
KOKKUVÕTE	52
SUMMARY	53
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	55
KASUTATUD VEEBIAADRESSID JA TARKVARA	63
LISA 1	64
LISA 2	65
LISA 3	68
LISA 4	69
LIHTLITSENTS.....	70

KASUTATUD LÜHENDID

CAM – Klooramfenikool

CPEC - *Circular Polymerase Extension Cloning*

IPTG – Isopropüül- β -tiogalaktoosiid

Kan – Kanamütsiin

Kan^R – Kanamütsiini resistentsusmarker

r-valgud – Ribosomaalsed valgud

SDS – Naatriumdodetsüülsulfaat

SISSEJUHATUS

Ribosoomid on makromolekulaarsed kompleksid, mille ülesanne on sünteesida valke ehk viia läbi translatsiooni. Ribosoomide struktuur on keeruline, sest need koosnevad kolmest RNA molekulist ning mitmekümnest valgust. Ribosoomide biogeneesi käigus sünteesitakse rRNA, mida protsessitakse ja modifitseeritakse, ja ribosomaalsed valgud (r-valgud), mida samuti modifitseeritakse. rRNA sünteesiga samaaegselt seonduvad sellega r-valgud ning rRNA struktuuris toimuvad järjestikkused muutused. Ribosoomide tootmine on seetõttu keeruline ja energiamahukas protsess. Alati ei kulge ribosoomide biogenees vigadeta ning kõik ribosoomid ei pruugi veatult toimida. Seetõttu on olemas ka mehhanismid ribosoomide lagundamiseks.

Ribosoomide biogeneesis on üks huvitavamaid küsimusi see, kuidas toimub 16S rRNA 3' otsa küpsemine. Sulthana ja Deutscher on näidanud, et selle protsessimiseks piisab neljast eksoribonukleasist (Sulthana ja Deutscher, 2013). Ent seejuures ei ole näidatud, kuidas need eksoribonukleasid suudavad ära tunda 16S rRNA küpse 3' otsa ning õigel ajal RNA lagundamisel peatuda. Peale selle on Jacob ja kolleegid näidanud 16S rRNA 3' otsa protsessimise defekti endoribonukleas YbeY puudumisel ning oletanud, et YbeY osaleb 16S rRNA protsessimises (Jacob *et al.*, 2013). YbeY osalust on näidatud ka ribosoomide lagundamisel (Anton Paier, avaldamata andmed, TÜTI, Eesti) ja kvaliteedikontrollis (Jacob *et al.*, 2013). Selle töö eesmärk on kontrollida hüpoteesi, et YbeY endoribonukleasne aktiivsus pole selle funktsioneerimiseks teatud protsessides, näiteks 16S rRNA 3' otsa protsessimisel, vajalik, vaid piisab korrektse struktuuriga YbeY interakteerumisest RNA või valkudega.

Selle magistritöö teoreetilises osas antakse ülevaade ribosoomidest, nende biogeneesist ja lagundamisest *Escherichia coli*'s (*E. coli*) ning *E. coli* endoribonukleasist YbeY. Eksperimentaalses osas uuritakse, kas YbeY endoribonukleasset aktiivsust on vaja YbeY funktsioneerimiseks klooramfenikooli poolt põhjustatud stressis ja kuumastressis. Samuti vaadeldakse, kas katalüütiliselt inaktiivsed YbeY mutandid on võimelised komplementeerima $\Delta ybeY$ tüve kasvudefekte.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Ribosoomid *Escherichia coli*'s

Ribosoomid koosnevad ribosomaalsest RNAST (rRNA) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud) ning tõlgivad mRNAs leiduva informatsiooni valgu aminohappeliseks järjestuseks, viies läbi valgusünteesi ehk translatsiooni. Ribosoomid moodustuvad kahest alamühikust, mis ühinevad translatsiooni initsiatsioonil ning valgusünteesi lõppedes eralduvad teineteisest. Ribosoomidel on keeruline struktuur, sest koosnevad mitmest rRNA molekulist ja paljudest erinevatest r-valkudest, mis peavad omavahel korrektselt interakteeruma selleks, et ribosoomid suudaksid oma funktsiooni translatsioonil täita. *Escherichia coli* (*E. coli*) suur ehk 50S alamühik koosneb 23S (2900 nt) ja 5S (120 nt) rRNAST ja 34 r-valgust ning väike ehk 30S alamühik koosneb 16S (1540 nt) rRNAST ja 21 r-valgust. 50S alamühik ja 30S alamühik moodustavad translatsiooni käigus 70S ribosoomi. Erinevad ribosoomiosakesed on oma nime saanud sedimentatsioonikiiruse järgi tsentrifuugimisel, mis sõltub nii osakeste massist kui ka kujust (Watson *et al.*, 2004).

1.2. Translatsioon *Escherichia coli*'s

Prokarüootides võib translatsioon toimuda transkriptsiooniga samaaegselt, sest kohe, kui RNA polümeraas on mRNA 5' otsa valmis sünteesinud, saab ribosoom sellega seonduda ja sellelt valku sünteesima hakata. Mõlema kompleksi liikumissuund on sama: mRNA 5' otsa poolt 3' otsa suunas. Translatsiooni kiirus on 2 kuni 20 aminohapet sekundis, mis vastab transkriptsiooni kiirusele 50-100 nukleotiidi sekundis. Ühelt mRNAlt võib samal ajal valku sünteesida mitu ribosoomi ning selliseid komplekse kutsutakse polüsoomideks (Watson *et al.*, 2004).

Ribosoomis on kolm olulist keskust, tänu millele translatsioon toimub. Suures alamühikus on peptidüültransferaasi keskus, kus toimub peptiidsidemete moodustamine kahe aminohappe vahel. Peptiidsideme katalüüsib rRNA, mitte r-valk, ning seetõttu kuulub ribosoom ka ribosüümide hulka (Cech, 2000). Väikeses alamühikus asub dekodeeriv keskus, kus mRNA koodonitele seonduvad vastavat antikoodonit omavad tRNA molekulid, mis kannavad mRNA koodoni poolt kodeeritavat aminohapet (Watson *et al.*, 2004). Peale selle asub suures alamühikus ka GAC (ingl *GTPase-associated centre*) reaktsioonikeskus, kus toimub mitmete translatsioonifaktorite funktsioneerimiseks vajalik GTP hüdroolüüs (Voorhees *et al.*, 2010).

Translatsioon algab siis, kui mRNA seondub 30S alamühiku pinnal olevasse kitsasse kanalisse ning mRNAga seondub initsiaator-tRNA, mis alustab bakterite valkude sünteesi

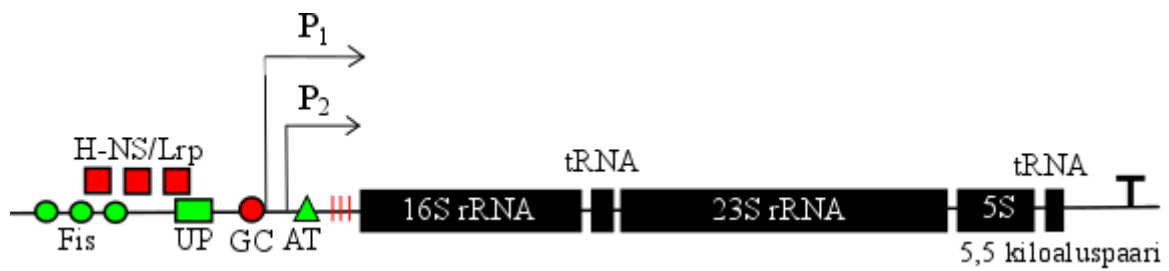
alati formüülmetioniiniga. Alles seejärel seondub nende kõigiga 50S alamühik, nii et mRNA jääb 30S ja 50S alamühiku vahele. Need protsessid toimuvad translatsiooni initsiatsioonifaktorite abil. Ribosoomi alamühikute kokkupuutepinnal asuvad kolm tRNAde seondumissaiti, kus mRNA on tRNAdele ligipääsetav: A, P ja E saidid. A saiti seonduvad aminoatsüül-tRNA-d, P saidis asuvad peptidüül-tRNA-d ning E saidi kaudu lahkuvad tRNA-d, mis on peptiidahela järgmisele tRNAle edasi kandnud. Peptiidsideme sünteesil kantakse peptiidahel P saidis olevalt tRNAlt A saidis olevale tRNAle. Seejärel liigub mRNA ribosoomi saitides koodoni võrra edasi, kõik tRNA-d liiguvad järgmisesse saiti, laadimata tRNA lahkuvad E saidist ning A saiti seondub uuele koodonile vastavat aminohapet kandev aminoatsüül-tRNA. Peptiidid sünteesitakse N otsast C otsa suunas ning sünteesitav peptiid väljub ribosoomist suures alamühikus oleva kitsa peptiiditunneli kaudu. Nii mRNA kanali kui ka peptiiditunneli kuju on kitsas selleks, et takistada mRNA ja peptiidi sekundaarstruktuuride teket. Translatsioon lõpeb, kui ribosoomi A saiti liigub stopp-koodon ning selle tunnevad ära vabanemisfaktorid, mis katalüüsivad peptiidahela vabanemise tRNA küljest. Nende abil vabastatakse valminud peptiid ribosoomist ning ribosoomi alamühikud dissotsieeruvad. Seejärel võib alata uue mRNAga seondudes uus translatsioonitsükkel (Watson *et al.*, 2004).

1.3. Ribosoomide süntees *Escherichia coli*'s

Ribosoomide küpsemine on keeruline protsess, mis hõlmab endas rRNA sünteesi, selle protsessimist ja modifitseerimist; r-valkude sünteesi ja modifitseerimist; r-valkude ja ionide õigeaegset seondumist rRNAga ning järjestikkusi struktuuri konformatsioonilisi muutusi. Selle tulemusena tekivad funktsionaalsed ribosoomid. Eelmainitud protsessid ei pruugi toimuda ajas lineaarselt, vaid ka samaaegselt. Näiteks algab olemasoleva rRNA protsessimine transkripti 5' otsast juba siis, kui RNA polümeraas veel ülejäänud rRNA operoni transkribeerib. Ribosoomide kokkupanek ja küpsemine toimub *in vivo* temperatuuril 37°C umbes kahe minuti jooksul (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

1.3.1. rRNA protsessimine

Antud töö kontekstis on oluline tutvuda lähemalt *E. coli* rRNA protsessimisega. rRNA sünteesitakse seitsmelt rRNA operonilt, kuhu peale 16S, 23S ja 5S rRNA geenide kuulub sõltuvalt konkreetsest operonist ka üks kuni kolm tRNA geeni (Jin *et al.*, 2012; Condon *et al.*, 1995). rRNA operonide üldine ehitus on ära toodud joonisel 1.



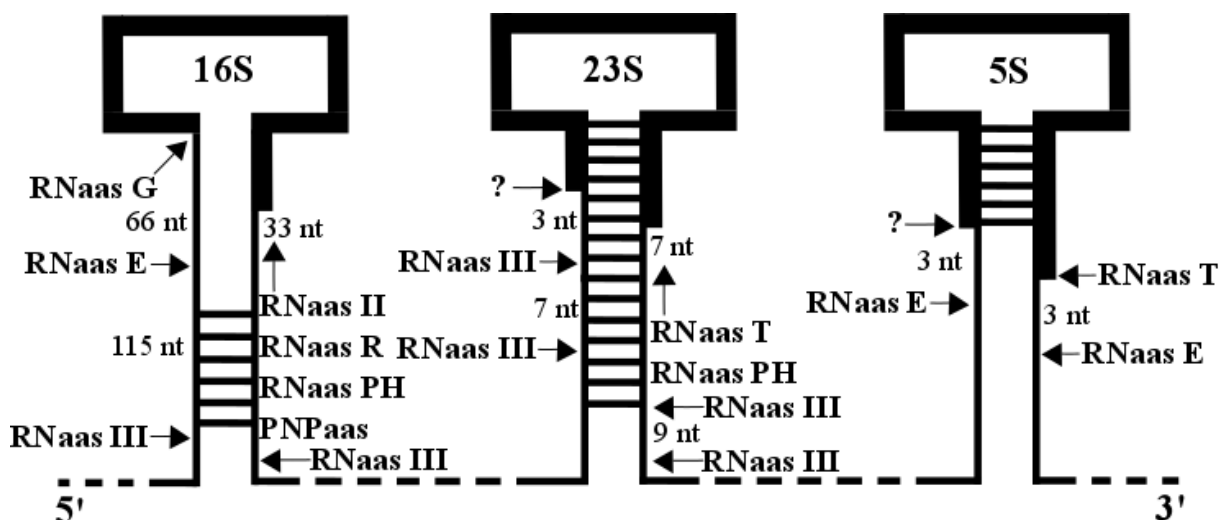
Joonis 1. *E. coli* *rrn* operonide üldine ehitus. Mustad kastid kujutavad rRNA ja tRNA geene. rRNA transkriptil on kaks promootorit (P1 ja P2) ning terminaatorid (T). Rohelised ja punased sümbolid kujutavad *rrn* operoni regulaatorelemente: punaste ruutudega on märgitud regulaatorvalkude H-NS ja Lrp seondumisala ning rohelistele ringidele regulaatorvalgu Fis seondumisala, roheline ristkülik tähistab UP elementi, punane ring guaniini ja tsütosiini rikast diskriminaator-regiooni, roheline kolmnurk antiterminatsioonisüsteemi ning punased püstkriipsud transkriptsiooniliste pauside ala (Jin *et al.*, 2012).

rRNA operoni transkripti protsessimist alustab endonukleas RNAas III juba ülejäänud transkripti transkribeerimise ajal, kui 16S rRNA ümbruses tekivad RNA sekundaarstruktuurid. rRNA operoni transkriptis tekivad kolm juuksenõelastruktuuri, mille linguosasse jäävad küpsed 16S, 23S ja 5S rRNA järjestused (vt joonis 2) (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Neid ümbritsevad järjestused moodustavad kaksikheeliksilaadse struktuuri. 16S ja 23S juuksenõela kaksikheeliksilaadset struktuuri lõikab RNAas III, eraldades 16S rRNA ja 23S rRNA üksteisest, tRNAst ja 5S rRNAst, kuid selle lõike tulemusena jäävad 16S ja 23S rRNA molekulide mõlemasse otsa siiski veel lisanukleotiidid, mida küpsetes ribosoomides ei leidu (vt joonis 2) (Young ja Steitz, 1978; Bram *et al.*, 1980) ning mis eemaldatakse teiste ribonukleasid poolt. RNAas III lõigete tulemusena tekivad 16S rRNA eellasmolekul (17S rRNA), 23S rRNA eellasmolekul, 5S rRNA eellasmolekul (9S rRNA) ja tRNAde eellasmolekulid (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

RNAas III lõigetest jääb 23S rRNA 5' otsa 3 või 7 lisanukleotiidi ning 3' otsa 7-9 lisanukleotiidi (King *et al.*, 1986). On näidatud, et 23S rRNA 3' otsa lõplikuks küpsemiseks on vajalik eksoribonukleas RNAas T (Li *et al.*, 1999b), kuid välimised nukleotiidid eemaldab RNAas PH (Gutgsell ja Jain, 2012). See mehhanism on arvatavasti kujunenud välja selleks, et 23S rRNA 3' otsa küpsemine liiga kiiresti ei toimuks (Gutgsell ja Jain, 2012). Arvatakse, et 3' otsa lõplik protsessimine võib toimuda hilises ribosoomide kokkupaneku faasis (Li *et al.*, 1999b). 23S rRNA 5' otsa küpsemises pole täielikult selgusele jõutud, ent Deutscher (2009) on välja pakkunud, et viimase lõike teeb endoribonukleas, sest ei ole suudetud detekteerida vahepealseid lõikeprodukte.

RNAas E on endoribonukleas, mis lõikab kahes etapis 5S rRNA 9S eellasmolekuli lühemaks (Misra ja Apirion, 1979), ent see jätab siiski 5S rRNA mõlemasse otsa kolm lisanukleotiidi.

3' otsast eemaldab need nukleotiidid RNAas T (Li ja Deutscher, 1995), kuid 5' lisanukleotiidide eemaldavat ensüümi pole tuvastatud (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Deutscher, 2009). 5S rRNA protsessimine sarnaneb 23S protsessimisele peale RNAas T osaluse ka selle poolest, et 3' otsa protsessimine toimub korrektselt siis, kui 5S rRNA on ribosoomidesse pakitud, mitte eraldiseisvana (Li ja Deutscher, 1995) ehk arvatavasti toimub ka 5S lõplik küpsemine hilises ribosoomide kokkupaneku faasis (Deutscher, 2009).



Joonis 2. *E. coli* rRNA transkripti protsessimissaidid on tähistatud nooltega, paksem joon tähistab küpsete rRNA molekulide järjestust transkriptis, nukleotiidide arvud tähistavad kaugeima lõikekoha kaugust küpse rRNA molekuli otsast, küsimärgid tähistavad veel identifitseerimata ribonukleaaside lõikamist (Deutscher, 2009, täiendatud uuemate andmetega).

16S rRNA 5' otsa küpsemisel teevad koostööd kaks endoribonukleaasi, RNAas E ja RNAas G. RNAas III lõikest jääb 16S rRNA 5' otsa 115 lisanukleotiidist koosnev järjestus, mida lõikab RNAas E, jättes alles veel 66 nt (Li *et al.*, 1999a). Need lõikab maha RNAas G, tekitades küpse 16S rRNA 5' otsa (Li *et al.*, 1999a; Wachi *et al.*, 1999). 16S rRNA 3' otsa jääb RNAas III lõikamisel alles 33 lisanukleotiidi. Sulthana ja Deutscher on näidanud, et nende lisanukleotiidide eemaldamisel ei osale mitte endoribonukleaas, nagu senini arvati, vaid neli eksoribonukleaasi: RNAas II, RNAas R, RNAas PH ja PNPaas (Sulthana ja Deutscher, 2013). Kui metsiktüüpi tüves esineb 16S rRNAde populatsioonist vaid 2% eellasmolekulina, siis kõigi nende eksoribonukleaaside eemaldamisel tõuseb eellasmolekuli osakaal 87%-ni. Efektivseimalt suudavad lisanukleotiidid eemaldada RNAas II ja RNAas R ning PNPaas jääb neile kahele veidi alla. Teiste RNAaside puudumisel suudab RNAas PH aga taastada vaid 50% normaalsest 16S rRNA 3' otsa protsessimisest (Sulthana ja Deutscher, 2013). 5' ja 3' otsa protsessimise ajalisel suhtes pole leitud konsensust. Sulthana ja Deutscher on täheldanud, et

16S rRNA 5' otsa protsessimine sõltub ajaliselt 3' otsa protsessimise toimumisest. Kui 3' ots korrektselt ei küpse, on 5' otsa RNAas E lõikus tugevalt inhibeeritud. Nad arvavad, et 3' otsa lisanukleotiidide eemaldamisel kaob RNA kaksikheeliksilaadne struktuur ning 5' otsa järjestus muutub üksikahelaliseks RNAs, mida suudab siis substraadina kasutada RNAas E (Sulthana ja Deutscher, 2013). Vastupidisele järeldusele, et 16S rRNA 5' ja 3' otste protsessimine on teineteisest sõltumatu, on jõudnud Gupta ja Culver 30S alamühiku *in vivo* kokkupanekut uurides (Gupta ja Culver, 2014). Protsessimata 16S rRNA eellasmolekuli sisaldavat 30S alamühikut ei liideta 70S ribosoomide koostisesse, vaid lagundatakse (Sulthana ja Deutscher, 2013).

Sulthana ja Deutscheri tööst jääb 16S rRNA protsessimise mehhanismi suhtes vastamata küsimusi. Kuidas suudavad need eksoribonukleaasid lagundada kaksikheeliksilaadses sekundaarstruktuuris esinevat RNAd? Kuigi RNAas R ja PNPaas omavad seda võimaldavat helikaasset aktiivsust, vajaks näiteks RNAas II kindlasti eraldiseisva helikaasi abi (Sulthana ja Deutscher, 2013). Teine huvitav probleem puudutab seda, kuidas (protsessiivsed) eksoribonukleaasid tunnevad ära 16S rRNA küpse 3' otsa positsiooni ning RNA lagundamisel õigeaegselt peatuvad. Sulthana ja Deutscher on spekulerinud, et seda võivad mõjutada teised 16S rRNA 30S alamühikuks küpsemisega seotud ensüümid ja valgud ning üldine 30S alamühiku küpsemise kontekst (Sulthana ja Deutscher, 2013). Peale selle leidub siiski vähesel määral 16S rRNAd, mis isegi nende nelja ensüümi puudumisel protsessitakse. Sulthana ja Deutscher on välja pakkunud, et protsessitud 16S rRNA olemasolu eest võib nendel tingimustel vastutada mõni tuvastamata madala protsessiivsusega ribonukleaas või võib see olla tingitud kuumatundliku PNPaasi inhibeerimata jäänud alampopulatsioonist kuumastressis (44°C) (Sulthana ja Deutscher, 2013).

Seoses 16S rRNA protsessimisega on veel avastatud, et endoribonukleaas YbeY puudumisel tekivad 16S rRNA protsessimisel häired, eriti eellasmolekuli 3' otsas. Kujub 16S rRNA eellasmolekul 17S rRNA ning 16S rRNAst lühem 16S* rRNA molekul (Davies *et al.*, 2010). Peale selle on näidatud, et $\Delta ybeY \Delta rnr$ ja $\Delta ybeY \Delta pnp$ mutantides, kus puudusid vastavalt valgud YbeY ja RNAas R ning YbeY ja PNPaas, puudus peaaegu täielikult korrektselt protsessitud 16S rRNA 3' ots. $\Delta ybeY \Delta rph$ mutandis, kus puudusid valgud YbeY ja RNAas PH esines küll vähem küpset 16S rRNAd ja rohkem selle eellasmolekuli 17S, aga see muutus ei olnud nii silmapaistev kui $\Delta ybeY \Delta rnr$ ja $\Delta ybeY \Delta pnp$ mutantide puhul. RNAas II ja YbeY nullmutanti ei uuritud (Davies *et al.*, 2010). Sel ajal veel teadmata, et YbeY on endoribonukleaas, pakkusid Davies ja kolleegid oma tulemuste tõlgendamisel välja, et RNAas R ja PNPaas lagundavad 17S rRNA lisanukleotiidid ning YbeY osaleb selles protsessis nende

tegevuse moduleerijana (Davies *et al.*, 2010). Kui aga Jacob ja kolleegid avastasid, et YbeY on endoribonukleas, pakkusid nad välja, et YbeY protsessib 17S rRNA 3' otsa küpseks 16S rRNA otsaks ning et kuumastressis rakkudes on YbeY roll rRNA protsessimisel eriti oluline (Jacob *et al.*, 2013). Samas ei välistanud nad teiste ensüümide, eriti RNAas R-i ja PNPaasi osalust 16S rRNA 3' otsa protsessingus, arvestades seda, et YbeY on suhteliselt ebaspetsiifiline endoribonukleas (Jacob *et al.*, 2013).

1.3.2. Ribosoomide kokkupanek

Ribosoomide kokkupaneku käigus modifitseeritakse rRNAd. Enamlevinud rRNA modifikatsioonid on metüülrühmade lisandumine ning uridiini isomeriseerumine pseudouridiiniks (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). 16S rRNA modifikatsioonid pole 30S alamühiku aktiivsuse ega kokkupaneku seisukohalt eriti olulised (Krzyszosiak *et al.*, 1987), ent 50S alamühikute korrektseks kokkupanekuks on mõnede modifikatsioonide esinemine hädavajalik. Mõned modifikatsioonid saab sisse viia juba valguvabasse rRNAse, teiste puhul on vajalik teatud r-valkude seondumine rRNAGA, millest võib sõltuda modifitseerimiseks vajalik rRNA struktuur. Seetõttu arvatakse, et mõnede modifikatsioonide olemasolu võib olla ribosoomide kokkupaneku kontrollpunktiks – ribosoomide kokkupanek saab jätkuda alles siis, kui vastav modifikatsioon on rRNAse sisse viidud (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Ka r-valke modifitseeritakse post-translatsiooniliselt, kuid enamasti pole nende modifikatsioonide täpne roll teada (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Vaid L3 valgu metüülatsiooni puudumisel on selge fenotüüp: aeglasem kasv, külmatundlikkus ning ribosoomi alamühikute eellaste kuhjumine (Colson *et al.*, 1979; Lhoest ja Colson, 1981).

Ribosoomide kokkupanekul liidetakse ribosoomidega ka metalliioone, mille põhirolliks peetakse rRNA tertsiaarstruktuuride stabiliseerimist (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Üldiselt arvatakse, et rRNA üldine voltumine ja saavutatud struktuuri hoidmine on võimalik vaid rRNA enda molekulisiseste interaktsioonide mõjul, ent lõplik tertsiaarstruktuuri stabiilsus saavutatakse r-valkude seondumise abil (Serdyuk *et al.*, 1983; Wimberly *et al.*, 2000). Kuigi mõnel r-valgul on ka funktsiooni seisukohalt olulised interaktsioonid translatsioonifaktoritega, peetakse r-valkude peamiseks rolliks siiski rRNA struktuuride stabiliseerimist nii ribosoomide kokkupanekul kui ka küpsetes ribosoomides (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

30S alamühiku kokkupanekul on r-valkude seondumine rRNAGA kooperatiivne ja hierarhiline. Primaarselt seonduvad valgud seonduvad otse rRNAGA ning algatavad 30S alamühiku kolme domeeni nukleatsiooni. Sekundaarsete seondujate seondumiseks rRNAGA

on vaja interaktsioone primaarsete seondujatega. Tertsiaarsed seondujad vajavad aga vähemalt ühe primaarse ja ühe sekundaarse seonduja olemasolu, et rRNAga seonduda (Brodersen *et al.*, 2002). 30S alamühikute kokkupanek kulgeb rRNA 5' otsast 3' otsa suunas ning see toimub kotranskriptsiooniliselt (de Narvaez ja Schaup, 1979; Powers *et al.*, 1993). On tõendeid, et 30S alamühikute kokkupanek võib toimuda mitme alternatiivse raja kaudu (Powers *et al.*, 1993; Bubunenکو *et al.*, 2006).

50S alamühiku kokkupanek sarnaneb põhimõtteliselt 30S alamühiku kokkupanekule, ent on mitmel põhjusel keerulisem. Williamson (2003) on toonud välja kolm peamist põhjust. Esiteks on 23S rRNA peaaegu kaks korda suurem kui 16S rRNA ning kokkupanekul osaleb 30S alamühiku 21 r-valgu asemel 34 r-valku. Teiseks ei vasta 23S rRNA sekundaarstruktuuride kaardi kuus domeeni (Gutell, 1996) otseselt tertsiaarstruktuuri domeenidele. See viitab r-valkude seondumise äärmuslikule kooperatiivsusele ja sellele, et 50S alamühiku kokkupanek ei pruugi toimuda 5'→3' suunas (Williamson, 2003). 50S alamühiku kokkupanekul seonduvad r-valgud 23S rRNA kõigi domeenidega igas kokkupaneku etapis (Chen ja Williamson, 2013). Kolmandaks puuduvad mõnedel 50S alamühiku r-valkude domeenidel korrapärased sekundaarstruktuurid ning need ulatuvad 50S alamühiku sisse, täites rRNA vahele jäävaid tühimikke ja interakteerudes rRNA erinevate domeenidega (Ban *et al.*, 2000).

Ribosoomide kokkupanekul võib tekkida ka vigu. Näiteks võib rRNA võtta valesid sekundaarstruktuure, mis on väga stabiilsed (Weeks, 1997), või mõni kokkupaneku intermediaat võib jääda kineetilisse lõksu, kust õigesse konformatsiooni jõudmiseks on vaja lisaenergiat (Woodson, 2000). Selliste probleemide lahendamiseks on rakkudes olemas ribosoomide küpsemise kofaktorid, mis kiirendavad ribosoomide kokkupanekut, alandades ribosoomide küpsemiseks vajalikku aktivatsioonenergiat (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). RNA *chaperon*-valgud võivad aidata rRNA-d kineetilistest lõksudest välja seda lahti harutades või tuua kokku erinevad rRNA osad, aidates niiviisi rRNA-l vajalikke interaktsioone moodustada (Lorsch, 2002). RNA helikaasid on valgud, mis suudavad RNA kaksikheelikseid lahti harutada. Arvatakse, et *E. coli*'s osaleb ribosoomide biogeneesis kolm DEAD-box valguperekonna RNA helikaasi: SrmB, CsdA (DeaD) ja DbpA (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004; Diges ja Uhlenbeck, 2001). GTPaasid on kolmas valkude klass, mida teatakse ribosoomide küpsemisel osalevat. Mitmete GTPaaside puudumisel on märgatud ka vigu rRNA protsessimisel. Peale selle on olemas mitmeid ribosoomide kokkupaneku/küpsemise faktoreid, mis ei kuulu ühtegi eelpool mainitud valkude rühma, ent

sellegipoolest on ribosoomide korrektseks küpsemiseks hädavajalikud (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

1.4. Ribosoomide ja rRNA lagundamine *Escherichia coli*'s

Võrreldes mRNAga on rRNA ja tRNA eluiga pikem ja seetõttu kutsutakse neid stabiilseks RNAks. Ribosoomide tootmine on vajalik raku kasvamiseks ja jagunemiseks, et rahuldada raku vajadust uute valkude järele. Seejuures aga nõuab ribosoomide tootmine ka ise RNA ja valkude tootmist ning on seetõttu väga energiamahukas. Ometi esineb rakkudes ribosoomide lagundamist, mis otsekui viitab sellele, et rakk laseb raisku minna ressurssidel, mis on ribosoomide sünteesimiseks kulutatud.

Ribosoomide lagundamine on termin, mida kasutatakse erinevates ribosoomi elutsükli faasides toimuva rRNA või ribosoomi osakeste lagundamise kirjeldamiseks. Ribosoomide biogenees on väga keeruline protsess, mille igas etapis võib tekkida vigu, mida ei õnnestu isegi ribosoomide küpsemise kofaktorite abil parandada. Selliste puudulike vaheproduktide või küpsete ribosoomide eemaldamine on oluline selleks, et translatsioon saaks toimuda efektiivselt ning mRNA molekulid ei jääks vigastesse ribosoomidesse „kinni“. Põhilised lagundamisprotsessid toimuvad vigade tõttu rRNA protsessimisel ja ribosoomide kokkupanekul ning küpseid ribosome inaktiveerivate mutatsioonide tõttu. Ent leitud on tõendeid ka selle kohta, et teatud füsioloogilistes tingimustes või stressi korral lagundatakse *E. coli*'s täiesti terveid küpseid ribosome (Deutscher, 2009; Maiväli *et al.*, 2013).

Ribosoomide lagundamise erinevate protsesside eristamine ei ole lihtne, sest rRNA laguproduktid on samad nii valesti protsessitud rRNA, ribosoomide kokkupaneku erinevate intermediaatide kui ka küpsete ribosoomide lagundamisel. Arvatakse, et erinevad ribosoomide ja rRNA lagundamise rajad võivad osaliselt mehhanismi poolest kattuda või isegi identsed olla (Deutscher, 2009). rRNA lagundamisel võivad osaleda nii endo- kui ka eksoribonukleasid. Suuremate ribosoomi osakeste puhul arvatakse, et lagundamisprotsessi algatab veel tundmatu endoribonukleas ning seejärel saavad eksoribonukleasid, nagu näiteks RNAas II, RNAas R, RNAas PH ja PNPaas, lagundada ligipääsetavaks muutunud rRNA tükid (Deutscher, 2009).

1.4.1. rRNA protsessimise ja ribosoomide kokkupaneku vead

Kuna rRNA protsessimine ja ribosoomide kokkupanek toimub samaaegselt, ei ole nende käigus tekkinud vigu lihtne eristada ning võib-olla pole see ka vajalik. Vead ühes protsessis võivad mõjutada teist protsessi ja vastupidi. On näidatud, et teatud mutatsioonidega rRNA-d või r-valke sisaldavaid ribosoomiosakesi ei liideta ribosoomidesse (Liiv *et al.*, 1996;

Schäferkordt ja Wagner, 2001; Deutscher, 2009). See tähendab arvatavasti seda, et neis on ribosoomide kokkupanekul tekkinud vead, mida ei suudeta parandada ja mistõttu need vigased ribosoomi osakesed lagundatakse (Deutscher, 2009; Schäferkordt ja Wagner, 2001).

Deutscher on esitanud huvitava küsimuse: miks tingivad vead ribosoomide kokkupanekul ribosoomide lagundamise? Ta on pakkunud välja kaks võimalikku vastust (Deutscher, 2009).

- 1) rRNA on küpsetesse alamühikutesse pakituna lagundamist alustava endoribonukleaasi eest kaitstud, kuid kokkupaneku vigade esinemisel jääb mingi osa rRNAst endonukleaasi(de)le ligipääsetavaks, mistõttu algab lagunemine.
- 2) Valesti kokku pakitud ribosoomide alamühikud ei suuda osaleda translatsioonil, mis tähendab, et need ei liitu 70S ribosoomideks. Võib-olla on rRNA endoribonukleaaside eest kaitstud hoopis küpsetes 70S ribosoomides, mitte küpsetes alamühikutes.

Probleem tekib rakkudes siis, kui vigaseid rRNA fragmente ei eemaldata, sest r-valgud suudavad arvatavasti ka nendega seonduda. See aga lööb välja r-valkude tasakaalu korrektse rRNAga seostumisel ja ribosoomide alamühikuid ei suudeta normaalselt kokku panna, mistõttu hakkavad puudulikud ribosoomiosakesed kuhjuma (Deutscher, 2009). On avastatud, et PNPaas ja RNAas R on need eksoribonukleaasid, mis suudavad eemaldada vigaseid rRNA fragmente, mis tekivad nii küpsetest ribosoomidest kui ka vigastest kokkupaneku vaheproduktidest (Cheng ja Deutscher, 2003). Sellised fragmendid võivad arvatavasti tekkida erinevatel põhjustel, kuid nende fragmentide tekitaja, lagundamist initsieeriva endoribonukleaasi identiteet pole teada (Cheng ja Deutscher, 2003).

On teada, et mõningad antibiootikumid takistavad peale valgusünteesi ka ribosoomide korrektset kokkupanekut. Näiteks mõjutavad erütromütsiin ja asitromütsiin 50S alamühiku kokkupanekut ja neomütsiin 30S alamühiku kokkupanekut (Chittum ja Champney, 1995; Foster ja Champney, 2008). Teatud erütromütsiini ja klooramfenikooli töötluse puhul kuhjuvad rakkudesse 50S ja 30S eellasosakesed (Siibak *et al.*, 2009), mille valguline koostis ei sarnane teadaolevatele ribosoomide kokkupaneku intermediaatidele. Kokkupuude klooramfenikooli ja erütromütsiiniga viib r-valkude tasakaalustamata sünteesini, mille mõjul puudulikud ribosoomide lisaosakesed tekivad (Siibak *et al.*, 2011). Antibiootikumide mõjul, mis segavad ribosoomi osakeste korrektset kokkupanekut, kuhjuvad kokkupaneku vaheproduktid, mis lagundatakse seejärel RNAaside poolt (Silvers ja Champney, 2005). Asitromütsiiniga ribosoomide kokkupaneku defektide tekitamisel on leitud, et rRNA fragmente suudab eemaldada peale eelnevalt mainitud RNAaside ka RNAas II (Silvers ja Champney, 2005). RNAas E osalust ribosoomi lisaosakeste lagundamisel on näidatud

erütmütsiini töötuse puhul (Usary ja Champney, 2001). Neomütsiini ja paromomütsiini töötuse puhul osalevad rRNA lagundamisel rRNA protsessivad nukleasid RNAas III, RNAas E, RNAas G ja RNAas PH (Frazier ja Champney, 2012).

1.4.2. Küpsed ribosoomid

Küpseid 70S ribosoomi peetakse üldiselt RNAasidele ligipääsmatuteks (Deutscher, 2009). Ent igal reeglil on ka erandeid. RNAas I peetakse üheks neist. RNAas I on mittespetsiifiline endoribonukleas, mis esineb *E. coli*'s enamasti periplasmaatilises ruumis (Neu ja Heppel, 1964). Teatud juhtudel, kui rakumembraan saab kahjustada, on märgatud RNAas I rakku sisenemist ning ulatuslikku RNA, sh rRNA, lagundamist. Kuigi väike osa RNAas I leidub ka tsütoplasmas tavaolukorras, on levinud arvamused, et see on seal inaktiivsena (Deutscher, 2009). On näidatud, et 16S rRNA heeliks 41 on RNAas I spetsiifiline inhibeeriija (Kitahara ja Miyazaki, 2011).

Jacob ja kolleegid on *in vitro* katsetega on näidanud, et endoribonukleas YbeY ja eksoribonukleas RNAas R osalevad 70S ribosoomide kvaliteedikontrollis ning selleks on vajalik YbeY endoribonukleasne aktiivsus (Jacob *et al.*, 2013). YbeY ja RNAas R lagundavad koostöös vigast 30S alamühikut sisaldavad 70S ribosoomid, mis sisaldavad näiteks 17S, 16S* ja lühemaid 16S rRNAst pärit rRNA molekule. Seega võimaldab selliste translatsiooniliselt inaktiivsete ribosoomide lagundamine saavutada rakus efektiivsema translatsiooni. See kvaliteedikontrolli süsteem on eriti oluline stressitingimustes, sest YbeY puudumisel on rakud stressile väga tundlikud (Jacob *et al.*, 2013). Selle 70S ribosoomide kvaliteedikontrolli mehhanismi olemasolu on kinnitanud ka Anton Paieri katsed küpsete ribosoomidega, mis on alamühikute vahelises B2a sillal esineva mutatsiooni A1919G poolt inaktiivseteks muudetud. Selle mutatsiooni mõjul lagundatakse metsiktüüpi tüves 350 minuti jooksul umbes 50% 30S ja 50S alamühikutest, ent YbeY või RNAas R puudumisel ribosoomid stabiliseeruvad (Anton Paier, avaldamata andmed, TÜTI, Eesti). Seega näib, et YbeY ja RNAas R võivad osaleda 70S ribosoomide kvaliteedikontrollis ka teistsugustel tingimustel, kui on kirjeldanud Jacob ja kolleegid (Jacob *et al.*, 2013).

Küpsete ribosoomide kadumist on täheldatud ka *E. coli* rakkudes pärast vähemalt tunniajalist töötust antibiootikumiga mitomütsiin C (5µg/ml) (Suzuki ja Kilgore, 1967).

1.4.3. Ribosoomide lagundamise põhjused

Näljastressis rakkudes on märgatud ulatuslikku ribosoomide lagundamist (Deutscher, 2003). Arvatakse, et ribosoomi hakatakse lagundama näljastressis rakkudes selleks, et vabastada ribosoomidesse koondunud toitaineid (Kaplan ja Apirion, 1975a). rRNA kadu on näidatud nii

süsiniku, lämmastiku, fosfori kui ka Mg^{2+} ionide puudumisel (Jacobson ja Gillespie, 1968; Davis *et al.*, 1986; Kaplan ja Apirion, 1975b). Seejuures näib ribosoomide lagundamine kõige ulatuslikum olevat süsinikuallika vaeguses ning kõige väiksemal määral toimuvat fosforipuuduses (Kaplan ja Apirion, 1975b). Ribosoomide lagundamisel jäävad r-valgud stabiilseks, nii et rakk saab kiiresti sünteesida uued ribosoomid siis, kui keskkond muutub rakkude jaoks soodsamaks ja transkribeeritakse uus rRNA (Jacobson ja Gillespie, 1968; Kaplan ja Apirion, 1975a; Ramagopal, 1984). On näidatud, et ribosoomide lagundamine algab kohe, kui mõne toitainete puudumine kasvule limiteerivaks osutub, kuid enne kui rakkude kasv lakkab ja elulemus vähenema hakkab (Davis *et al.*, 1986). Näljastressis toimub ribosoomide lagundamine arvatavasti sama skeemi järgi nagu eelnevalt kirjeldatud: tundmatu(d) endonukleas(id) teevad esimese lõike, mille järel eksoribonukleasid tekkinud lühemad rRNA fragmendid lagundavad. Näljastressis on näidatud RNAas II ja PNPaasi osalust rRNA fragmentide lagundamisel (Kaplan ja Apirion, 1975b).

Basturea ja kolleegid on näidanud, et ribosoomide lagundamise mehhanism on näljastressis ja kasvavate rakkude defektsete rRNAde lagundamise kvaliteedikontrolli rajas erinevad (Basturea *et al.*, 2011). Toitainete puuduse korral lagundatakse rakkudes ribosoomid, mis olid olemas enne stressi algust, ent ribosoomide kvaliteedikontrolli käigus lagundatakse värskelt sünteesitud puudulikke ribosoomid nende biogeneesi käigus. Näljastressis rakkudes osalevad ribosoomide lagundamisel põhiliselt RNAas II, RNAas R ja RNAas PH, kuid konstantse kasvu tingimustes osalevad ribosoomide kvaliteedikontrollirajas RNAas R ja PNPaas, nagu on näidanud ka Cheng ja Deutscher (Basturea *et al.*, 2011; Cheng ja Deutscher, 2003).

Ribosoomide lagundamist on tuvastatud erinevates kasvufaasides. On näidatud, et eksponentsiaalsest statsionaarsesse kasvufaasi üleminekul lagundatakse kasvu aeglustumisel rohkem kui pooled ribosoomid, mis eksponentsiaalse kasvu ajal toodetud on (Piir *et al.*, 2011). Statsionaarsesse faasi jõudes on ribosoomid mitme tunni vältel stabiilsed, nagu ka konstantse kasvukiirusega turbostaadis kasvades (Piir *et al.*, 2011). Post-statsionaarses faasis rakkudes laguneb elulemuse kadudes kuni 95% algsetest ribosoomidest, kusjuures kuhjuvad 30S ja 50S alamühikute laadsed ribosoomide osakesed, r-valkude hulk ja stöhhiomeetria on drastiliselt muutunud (Ramagopal, 1984).

Ribosoomide lagundamise võib kaasa tuua ka stress, mis tekib kokkupuutel erinevate keemiliste ühenditega. Nende hulka kuuluvad rakumembraani kahjustavad reagensid, nagu näiteks tolueen, dodetsüüldietanoolamiin ja Hg^{2+} ioonid (Jackson ja DeMoss, 1965; Lambert ja Smith, 1976; Beppu ja Arima, 1969). Arvatavasti toimub ribosoomide lagundamine neil

puhkudel RNAas I aktiveerimise või rakku sisenemise tagajärjena (Deutscher, 2003). Nagu juba eelnevalt mainitud, on ka antibiootikumide, nagu näiteks mitomütsiin C, juuresolul on täheldatud ribosoomide lagundamist (Suzuki ja Kilgore, 1967; Deutscher 2003).

Tõsiste DNA kahjustuste tagajärjel aktiveerub *E. coli*'s apoptoositaolise surma rada (ingl *apoptosis-like death*), mida vahendavad RecA ja LexA valgud (nagu ka SOS vastust). Apoptoositaolist surma iseloomustavad näiteks DNA fragmenteerumine ja rakumembraani depolariseerumine (Erental *et al.*, 2012), kuid ka ulatuslik rRNA lagundamine (Erental *et al.*, 2014). Apoptoositaolise surma korral on rRNA lagundamise jaoks vajalik endoribonukleaas YbeY, kuid mitte eksoribonukleaas RNAas R (Erental *et al.*, 2014), seega ei kattu selle lagundamise mehhanism nähtavasti 70S ribosoomide lagundamisega, nagu seda on kirjeldanud Jacob ja kolleegid (Jacob *et al.*, 2013).

1.5. YbeY

YbeY on *Escherichia coli* endoribonukleaas (Jacob *et al.*, 2013) ning kuumašokivalk (Nonaka *et al.*, 2006), mida kodeerib geen *ybeY*. YbeY struktuuris (vt joonis 3) (Zhan *et al.*, 2005; PDB andmebaasis ligipääsunumber 1XM5) on oluline osa metalliioonil (Ni^{2+} või Zn^{2+}), sest selle endoribonukleasne aktiivsus sõltub metalliiooni olemasolust (Jacob *et al.*, 2013). YbeY lõikab üksikahelalist RNAd, aga ka RNA juuksenõela struktuuride linguosa, mis on üksikahelaline, jättes lõikekoha 5' otsa hüdroksüülrühma ja 3' otsa fosfaatrühma (Jacob *et al.*, 2013). YbeY arvatakse osalevat rRNA protsessimisel või ribosoomide kokkupanekul (Davies *et al.*, 2010) ning ribosoomide kvaliteedikontrollis (Jacob *et al.*, 2013) ja lagundamisel (Anton Paier, avaldamata andmed, TÜTI, Eesti).

$\Delta ybeY$ tüves leidub metsiktüüpi tüvega võrreldes vähem transleerivaid polüsoome ja 70S ribosoomide ning rohkem vabu alamühikuid (Rasouly *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2010). On näidatud, et translatsiooni taseme ja täpsuse vähenemine $\Delta ybeY$ tüves on põhjustatud vigaste 30S alamühikute poolt (Rasouly *et al.*, 2010; Davies *et al.*, 2010) ning komplementatsioon metsiktüüpi YbeY-ga ei suuda 30S defekti parandada, kui selle biogenees juba toimunud on (Rasouly *et al.*, 2010). Seda seletaks oletus, et YbeY on vajalik 16S rRNA 5' ja 3' otsa korrektseks maturatsiooniks ning väiksemal määral mõjutab YbeY ka 23S ja 5S rRNAde otste protsessimist (Davies *et al.*, 2010). YbeY ei ole leitud seondununa transleerivate ribosoomide ega vabade alamühikutega, vaid ribosoomide puhastamisel on selle olemasolu detekteeritav S100 fraktsioonis (Rasouly *et al.*, 2010).

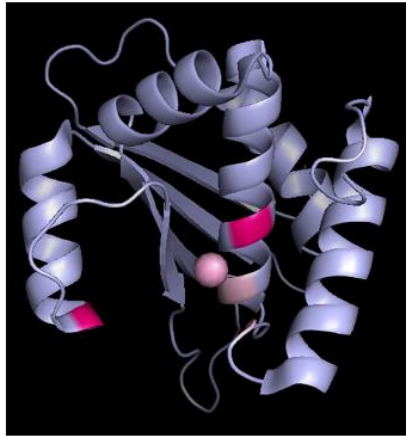
$\Delta ybeY$ tüves on täheldatud vigu 16S rRNA protsessimisel. Peale korrektselt küpsenud 16S rRNA leidub totaalses raku RNAs suuremal hulgal ka selle 17S eellasmolekuli ning lühemat

varianti, mida on hakatud nimetama 16S* rRNAks (Davies *et al.*, 2010). 16S* rRNA leidub vaid 30S alamühikutes, mitte transleerivas 70S ribosoomis (Davies *et al.*, 2010). 16S* rRNA puudub 16S rRNA korrektselt protsessitud 3' ots ning seetõttu pole see arvatavasti suuteline kanooniliste mRNAde translatsioonil osalema (Jacob *et al.*, 2013). Arvatakse, et 16S* rRNA sisaldavad 30S alamühikud ei ole võimelised 50S alamühikuga 70S ribosoomiks seonduma. Küll aga esineb *ΔybeY* tüves nii 30S kui ka 70S ribosoomide koostises võrreldes metsiktüüpi tüvega rohkem 17S rRNA. See võib seletada translatsiooni taseme vähenemist (Davies *et al.*, 2010), sest arvatakse, et vähemalt *in vitro* ei suuda 17S rRNA sisaldavad ribosoomid translatsioonil osaleda (Wireman ja Sypherd, 1974).

Kuumastressis (45°C) on *ΔybeY* tüve 16S rRNA 3' otsa protsessimine puudulik ning rakkudesse kuhjub 17S ja 16S* rRNA (Davies *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013). Kui aga uue RNA sünteesi rifampitsiini lisamisega takistada, on märgatud, et 16S rRNA kaob täielikult ning ka 17S rRNA tase hakkab ajas langema, ent 16S* rRNA tase ei muutu (Jacob *et al.*, 2013). Sellest on Jacob ja kolleegid järeldanud, et kuumastressis on YbeY endoribonukleasne aktiivsus vajalik 17S rRNA molekuli korrektseks protsessimiseks 16S rRNA molekuliks ning kui YbeY rakkudes ei leidu, tekib 17S rRNAst hoopis 16S* rRNA molekul (Jacob *et al.*, 2013).

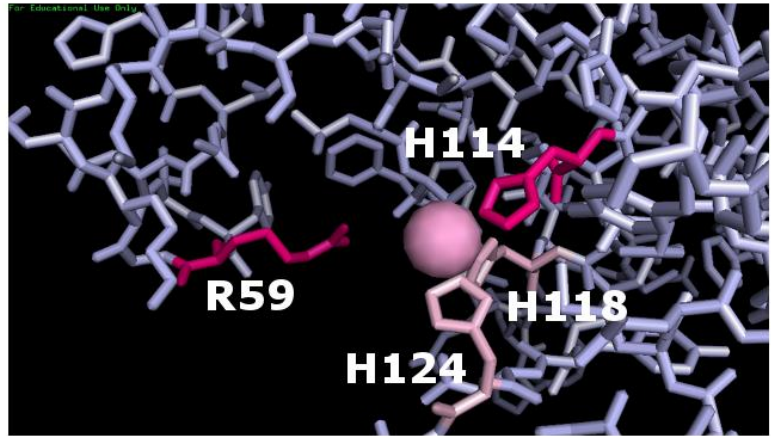
YbeY funktsioonide selgitamiseks on uuritud konserveerunud aminohapete rolli. On leitud kaks aminohapet, R59 ja H114 (vt joonis 3), mille muteerimiselalaniiniks ei suuda mutantne YbeY *ΔybeY* tüve kasvu kuumašokis täielikult komplementeerida (Davies *et al.*, 2010). Kuid 16S rRNA protsessimise fenotüüp on neil mutantidel erinev: YbeY-H114A komplementatsioonil on RNA profiil sarnane *ΔybeY* tüvele, samas kui R59A mutandist ei leitud 17S ega 16S* rRNA molekule nagu metsiktüüpi tüvestki (Davies *et al.*, 2010). H114 kuulub histidiini triaadi (H3XH5XH motiiv), mis arvatavasti interakteerub metalliiooniga (vt joonis 3). Ülejäänud kahe histidiini triaadi kuuluva aminohappe (H118 ja H124) muteerimiselalaniiniks kasvudefekte ei märgatud. R59 on suunatud metalliiooni suunas ning seetõttu on Davies ja kolleegid püstitanud hüpoteesi, et see aitab kinni hoida YbeY substraati (Davies *et al.*, 2010). Jacob ja kolleegid on näidanud, et YbeY valgu H114A ja R59A mutandid on *in vitro* vähemalt 10 000 korda väiksema endoribonukleasase aktiivsusega, ning on sellest järeldanud, et H114 ja R59 on vajalikud YbeY ribonukleasina toimimiseks (Jacob *et al.*, 2013).

A YbeY kristallstruktuur



B

YbeY arvatav aktiivtsenter



Joonis 3. Tumeroosaga on märgitud aminohappe jäägid R59 ja H114 (kuulub histidiini triadi), mille muteeriminealaniiniks muudab YbeY endoribonukleasina inaktiivseks. Heleroosaga on märgitud YbeY valguga seondud metalliioon ning histidiini triadi kaks ülejäänud aminohappejääki. A) YbeY kristallstruktuur. B) Lähivaade YbeY arvatavasse aktiivtsentrisse (Zhan *et al.*, 2005 järgi).

YbeY on seostatud ka ribosoomide lagundamisega. On näidatud, et YbeY osaleb koostöös eksoribonukleasiga RNAas R 70S ribosoomide kvaliteedikontrollis, lagundades vigaseid 30S alamühikuid sisaldavad 70S ribosoomid (Jacob *et al.*, 2013). YbeY ja RNAas R puudumisel ei lagundata küpseid ribosome ka *in vivo* (Anton Paier, TÜTI, Eesti). Peale selle lagundab YbeY rRNA apoptoositaolises surmas (Erental *et al.*, 2014).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Endoribonukleas YbeY rolli kohta 16S rRNA 3' otsa protsessimisel on esitatud kaks mudelit:

- 1) YbeY osaleb 16S rRNA 3' otsa protsessimisel endoribonukleasina (Jacob *et al.*, 2013). See tähendab, et üleliigsete nukleotiidide eemaldamiseks läheb vaja YbeY katalüütilist aktiivsust.
- 2) YbeY ei osale 16S rRNA 3' otsa protsessimisel endoribonukleasina, vaid on vajalik selleks, et tagada teiste ribonukleaside korrektne töö (Davies *et al.*, 2013). Näiteks võib YbeY seonduda 16S rRNA või eksoribonukleasidega, et takistada nende edasi liikumist 16S rRNA küpse 3' otsa juurest. Selleks ei ole vajalik YbeY katalüütiline aktiivsus, vaid võime RNA ja valkudega seonduda või interakteeruda ehk YbeY korrektne struktuur.

Sarnased mudelid võivad olla olulised ka YbeY rolli kirjeldamisel teistes protsessides, näiteks ribosoomide kvaliteedikontrollis (Jacob *et al.*, 2013) ja ribosoomide lagundamisel (Anton Paier, avaldamata andmed, TÜTI, Eesti). Selleks, et otsustada, kas YbeY põhifunktsioonid raku füsioloogias on seotud tema endoribonukleasne aktiivsusega, on võimalik kasutada YbeY mutante, mis ei ole katalüütiliselt aktiivsed. Jacob ja kolleegid on näidanud, et YbeY-R59A ja YbeY-H114A mutantidel on *in vitro* 30 nt RNA substraadi lagundamisel endoribonukleasne aktiivsus vähenenud vähemalt 10 000 korda (Jacob *et al.*, 2013). Kui nende mutantide fenotüüpi jälgida erinevates füsioloogilistes protsessides, on võimalik eristada, millistes protsessides läheb vaja YbeY endoribonukleasina ja millistes protsessides mitte. Kui YbeY inaktiivsed mutandid annavad WT tüve fenotüübi, on selge, et YbeY ensümaatiline aktiivsus pole oluline ja piisab selle interaktsioonidest RNA või valkudega, et oma funktsiooni täita. Kui aga inaktiivsete mutantide olemasolul tekib $\Delta ybeY$ fenotüüp, on YbeY endoribonukleasne aktiivsus uuritud protsessis vajalik.

Minu tööhüpotees:

YbeY endoribonukleasne aktiivsus pole oluline selle valgu funktsiooni täitmiseks teatud protsessides, näiteks 16S rRNA 3' otsa protsessimisel, vaid vajatakse selle interaktsioone rRNA või valkudega.

Minu eesmärgiks on paremini mõista YbeY toimemehhanisme rRNA protsessimisel, ribosoomide kokkupanekul ja nende lagundamisel.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Bakteritüved, oligonukleotiidid ja söötmed

Käesolevas töös kasutati metsiktüüpi *E. coli* tüvena BW25113 [rrnB3, Δ lacZ4787, hsdR514, Δ (araBAD)567, Δ (rhaBAD)568, rph-1], mis on K-12 derivaat (Baba *et al.*, 2006). Lihtsuse huvides nimetatakse seda selles töös metsiktüüpi tüveks (WT). Peale selle kasutati Keio kollektsiooni (Baba *et al.*, 2006) tüve, kust puudub YbeY ning mis on WT tüvega isogeenne ja erineb vaid mutatsiooni $\Delta ybeY$ poolest. Kõikides eksperimentides kasutati rakkude kasvatamisel LB söödet.

Praimerid, mida kasutati CPEC (ingl *Circular Polymerase Extension Cloning*) meetodi ja sekveneerimise jaoks, on toodud ära tabelis 1 lisas 1.

rRNA detekteerimiseks kasutati kahte tüüpi oligonukleotiide (vt tabel 2), mille 5' otsa on konjugeeritud fluorestseeruv ühend Cy5 või fluorestsiiin. Cy5 detekteeritakse otseselt selle enda fluorestsentsi abil. Fluorestsiiinile seotakse spetsiifiline antikeha, millega seotud reaktsioonide abil on oligonukleotiidi asukohta võimalik tuvastada kemoluminestsentsi abil. Kõik praimerid ja oligonukleotiidid on tellitud firmast Metabion.

Tabel 2. Antud töös kasutatud oligonukleotiidid.

Oligonukleotiid	Seondumispaik	Järjestus
23S-h25-Fluo	23S rRNA nt 527-551	5'-Fluo-CGC CTA AGC GTG CTC CCA CTG CCT C-3'
23S-190-Fluo	23S rRNA nt 163-184	5'-Fluo-GGT TCG CCT CAT TAA CCT ATG G-3'
23S-190-Cy5	23S rRNA nt 163-184	5'-Cy5-GGT TCG CCT CAT TAA CCT ATG G-3'
16S-1220-Fluo	16S rRNA nt 1995-1223	5'-Fluo-GCC CTG GTC GTA AGG GCC ATG ATG ACT TG-3'
EUB338-Cy5	16S rRNA nt 338-356	5'-Cy5-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

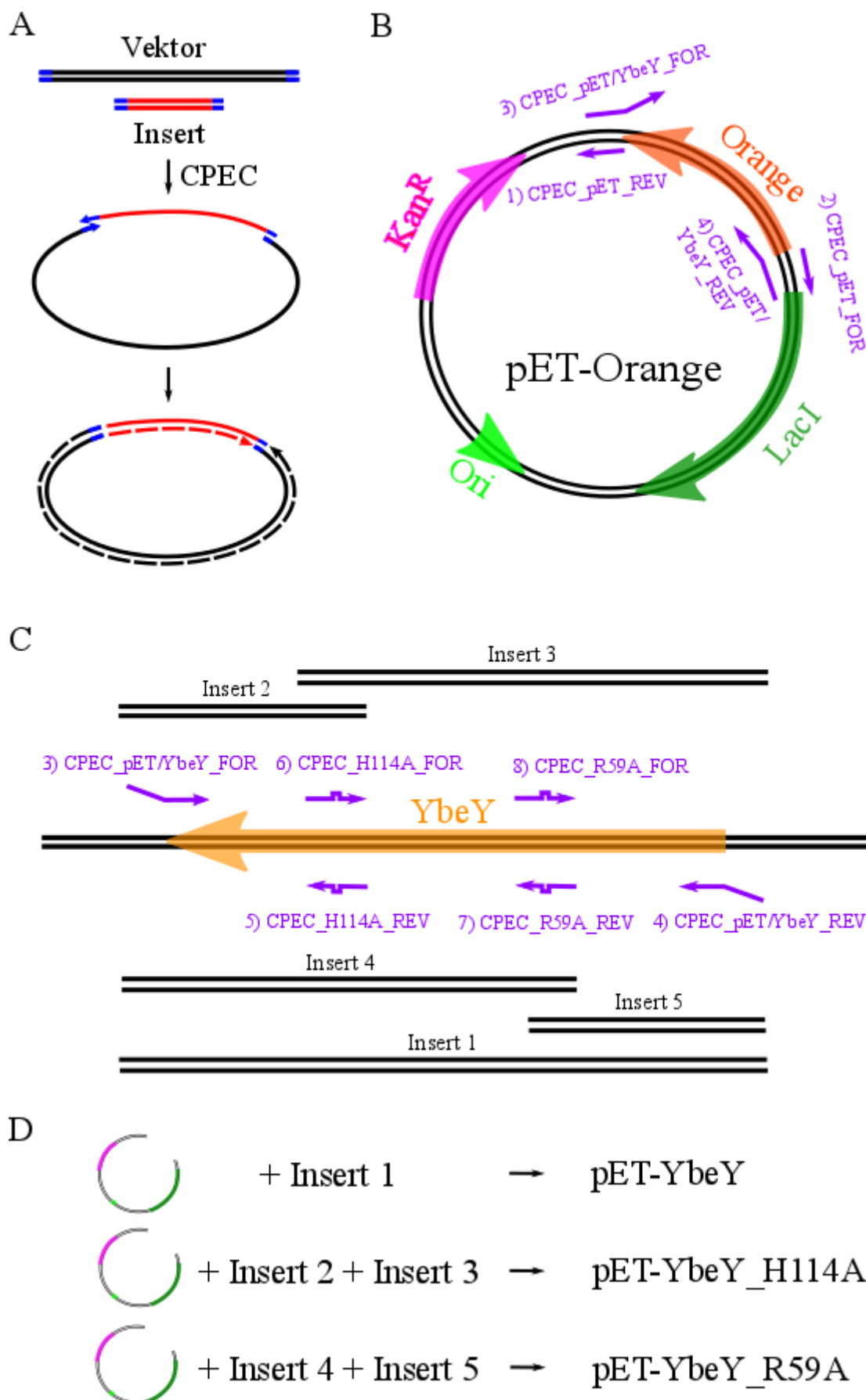
2.2.2. Komplementatsiooniplasmiidide konstrueerimine

$\Delta ybeY$ tüvele komplementatsiooniplasmiidide konstrueerimiseks kasutati CPEC (ingl *Circular Polymerase Extension Cloning*) meetodit, mis on DNA järjestusest sõltumatu kloneerimismeetod, mis põhineb vaid PCR-l (Quan ja Tian, 2009). Plasmidi konstrueerimiseks paljundatakse nii vektor kui ka insert PCR-ga nii, et neil tekivad üksteisega kattuvad otsad, mille hübridiseerumise T_m on väga sarnane. CPEC reaktsiooni ajal hübridiseeruvad vektor ja insert ülekattuvate otste abil ning üksteist matriitsina kasutades

pikendatakse DNA ahela 3' otsi, kuni tekib terviklik rõngasmolekul (vt joonis 4, paneel A), mis transformeeritakse otse rakkudesse. Rakkudes ligeeritakse sünteesitud DNA ahelad kokku raku enda ligaasi abil. CPEC meetodit kasutades on võimalik vektorisse sisestada ka mitu inserti või isegi mitu insertide raamatukogu.

ΔybeY tüvele konstrueeriti komplementatsiooniplasmiidid pET-YbeY, pET-YbeY_H114A ja pET-YbeY_R59A (protokoll Quan ja Tian, 2011 järgi). Selleks disainiti praimerid, nagu on kirjeldatud joonisel 4 paneelidel B ja C (järjestused toodud tabelis 1 lisas 1). Praimerite disainimiseks kasutati SnapGene tarkvara (GSL Biotech). Praimerite hübridiseerumisel nii üksteisega kui ka plasmiidide või genoomiga on $T_m=60^{\circ}\text{C}$. PCR matriitsiks kasutati plasmide pET-Orange ja pET-Crimson (konstrueerinud Arvi Jõers) ning WT tüve genoomset DNAd (100 μl rakke lüüsitud MQ vees 5 minuti jooksul temperatuuril 95°C). PCR reaktsioonides kasutati Phusion polümeraasi (ThermoScientific) selle kõrge protsessiivsuse, täpsuse ja sünteesimiskiiruse tõttu.

Selles töös kasutati kõigi PCR produktide, plasmiidide ja restriksioonifragmentide visualiseerimiseks 1% agarosgeeli 1xTAE-s (lisatud etiidiumbromiid (Invitrogen) lõppkontsentratsiooniga 0,6 $\mu\text{g/ml}$). PCR meetodil paljundati eraldi inserdid ja vektorid (vt tabelid 3, 4 ja 5 lisas 2) ning puhastati agarosgeelist Invisorb® Spin DNA Extraction kiti (STRATEC molecular GmbH) abil tootja juhiseid järgides. Neid kasutati eri kombinatsioonides pET-YbeY, pET-YbeY_H114A ja pET-YbeY_R59A valmistamiseks CPEC reaktsioonil (vt joonis 4 paneel D ning tabelid 6, 7 ja 8 lisas 2). CPEC PCR reaktsiooni eripäraks on lisandunud aeglase järk-järgulise hübridisatsiooni etapp. pET-YbeY saamiseks kasutati pET-Orange'i baasil paljundatud vektorit ning inserti 1. pET-YbeY_H114A saamiseks kasutati pET-Orange'i baasil paljundatud vektorit ning inserte 2 ja 3, mille ülekattuvas osas on YbeY geeni 114. koodon CAC (kodeerib histidiini) muudetud koodoniks GCC (kodeeribalaniini). pET-YbeY_R59A saamiseks kasutati pET-Crimsoni baasil paljundatud vektorit ning inserte 4 ja 5, mille ülekattuvas osas on YbeY geeni 59. koodon CGC (kodeerib arginiini) muudetud koodoniks GCC (kodeeribalaniini). 1 μl CPEC reaktsiooni produkti transformeeriti 50 μl DH5 α kompetentsetesse rakkudesse (Sambrook ja Russell, 2001). Rakud kasvatati üleöö 37°C juures, saadud kolooniad külvati 3 ml kanamütsiini (Kan) (25 $\mu\text{g/ml}$) sisaldavasse LB vedelsöötmesse, kasvatati üleöö temperatuuril 37°C kiirusel 210 rpm raputades ning plasmiid eraldati Invisorb® Spin Plasmid Mini Two kitiga (STRATEC molecular GmbH) vastavalt tootja juhistele.



Joonis 4. A) CPEC meetodi üldskeem. PCR teel paljundatud vektor ja insert hübridiseeruvad CPEC reaktsioonil komplementaarsete otste abil. Üksteist matriitsina kasutades sünteesitakse

vabadest 3' ottest teine ahel. Rõngasmolekuli jääb sisse kaks üheaahelalist katket, mis ligeeritakse kokku alles bakteris. B) Praimerite asukohad plasmiidil pET-Orange vektori paljundamiseks. Ära on toodud ka insertide paljundamiseks kasutatud praimerid, mille 5' otsad on vektoriga komplementaarsed. pET-Crimsoni ehitus on samasugune nagu pET-Orange'l, kuid Orange geeni asemel on Crimson geen. C) Praimerite asukohad WT tüve genoomil *ybeY* geeni insertide paljundamiseks. Kõigi praimerite numbrid, nimed, seondumiskohad ja järjestused on ära toodud tabelis 1 lisas 1. D) Komplementatsiooni-plasmiidide konstrueerimisel kasutatud insertide kombinatsioonid.

Saadud plasmiidide õigsust kontrolliti restriksiooniga (restriktaasid Eco9II ja Bsp68I 1x Orange puhvris 37°C 1 h). Nukleotiidsed järjestused kontrollimiseks paljundati huvipakkuv osa (*YbeY* geen ja selle promootorala) PCR-ga (vt tabelid 9 ja 10) ning sekveneeriti. Restriksioonanalüüs ja PCR andsid oodatavad tulemused, kuid pET-*YbeY*_R59A puhul tekkis PCR-l oodatud ühe produkti asemel kaks. PCR-l saadud oodatud suurusega (1056 bp) produktide sekveneerimine kinnitas *YbeY* valgu geeni oodatud asukohta plasmiidis ning mutatsioonide CAC→GCC ning CGC→GCC esinemist oodatud positsioonides vastavalt pET-*YbeY*_H114A ja pET-*YbeY*_R59A plasmiidides, kuid pET-*YbeY*_R59A *ybeY* geeni promootoraalas esinesid mutatsioonid, mida teistes plasmiidides polnud. Selleks, et tõsta R59A mutatsiooniga *YbeY* valk teiste plasmiidide järjestusega samasse konteksti, restrikteeriti nii pET-*YbeY*_R59A kui ka pET-*YbeY* vaid üht lõikekohta omavate restriктаasidega SalI ja BglII (1x Orange puhvris 1 h 37°C juures) ning ligeeriti pET-*YbeY* plasmiidist saadud vektor ja pET-*YbeY*_R59A plasmiidist saadud insert (2 µl T4 DNA ligaasiga 1x T4 DNA ligaasi puhvris 20 min 22°C juures). Ligatsiooniprodukt transformeeriti eelkirjeldatud moel DH5α kompetentidesse ning plasmidi eraldamiseks kasutati sama protokoll. Uue pET-*YbeY*_R59A plasmidi õigsust kontrolliti samamoodi restriksiooni, PCR-i ja sekveneerimisega. Sekveneerimistulemus kinnitas peale mutatsiooni R59A olemasolu ka seda, et *ybeY* geeni ümbritsev järjestus on samasugune kui pET-*YbeY* ja pET-*YbeY*_H114A plasmiididel. Konstrueeritud plasmiidid transformeeriti eelkirjeldatud moel *ΔybeY* tüvesse, kust oli eemaldatud kanamütsiini resistentsusmarker.

2.2.3. Kanamütsiini markeri eemaldamine *ΔybeY* tüvest

Selleks, et edasistes katsetes saaks kasutada *ΔybeY* tüves pET-*YbeY* komplementatsiooniplasmiide, mis sisaldavad kanamütsiini resistentsusgeeni, eemaldati Keio kollektsiooni *ΔybeY* tüvest Kan^R marker, mis oli jäänud *ybeY* geeni eemaldamisel selle otse järjestuste vahele (Datsenko ja Wanner, 2000; Baba *et al.*, 2006). Kanamütsiiniresistentsuse marker eemaldati Datsenko ja Wanneri protokoll järgi (Datsenko ja Wanner, 2000). *ΔybeY* tüve kompetentsetesse rakkudesse transformeeriti plasmiid pCP20 ning kasvatati üleöö ampitsilliini sisaldaval (100 µg/ml) LB plaadil temperatuuril 30°C. Seejärel külvati mõned

kolooniad mitteselektiivsetele LB plaatidele ning inkubeeriti üleöö 43°C juures. Kõrgem temperatuur indutseerib FLP rekombinaasi ekspressiooni pCP20 plasmiidilt, kuid muudab ka pCP20 replikatsiooni ebastabiilseks, nii et plasmiid ei kandu rakujagunemisel edasi. FLP rekombinaas lõikab FRT järjestuste vahel oleva Kan^R markeri välja ning seega kaotavad rakud nii ampitsilliini kui ka kanamütsiini resistentsuse. Saadud kolooniaid testiti joonkõlvidega ampitsilliini ja kanamütsiini resistentsuse suhtes, katseteks valiti välja tüvi, mis ei suutnud kumbagi antibiootikumi sisaldavatel LB plaatidel ellu jääda.

Seejärel kontrolliti, kas välja valitud $\Delta ybeY/\Delta Kan^R$ tüves on alles jäänud seni uuritud $\Delta ybeY$ tüvele iseloomulik rRNA protsessimise fenotüüp (kolm iseloomulikku vööti: 17S, 16S ja 16S* rRNAd). Selleks lüüsi 3 ml üleööökultuuri rakke ja puhastati RNA kuuma fenooli ja 1% SDS (naatriumdodetsüülsulfaat) seguga (vt ptk 2.2.5.) ning viidi läbi denatureeriv geelelektroforees (vt ptk 2.2.7.1). RNA visualiseerimiseks kasutati Sybr Gold värvi (Invitrogen) (10 000x lahjendus MQ vees, inkubatsioon 1 h).

2.2.4. Kasvukõverate ja –parameetrite mõõtmine

Nendes katsetes kasutati WT, WT + pET-Orange, $\Delta ybeY$, $\Delta ybeY$ + pET-Orange, $\Delta ybeY$ + pET-YbeY, $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A ja $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_R59A tüvesid, kusjuures $\Delta ybeY$ tüvedest oli eemaldatud Kan^R marker. pET-Orange kasutati pET plasmiidide kontrollina.

Uuritavate tüvede üleööökultuuridest inokuleeriti rakud 3 ml LB söötmesse, kuhu lisati pET plasmiidi sisaldavate tüvede puhul kanamütsiini (25 µg/ml). Neid kultuure kasvatati 37°C juures loksutades paar tundi, kuni kõik olid jõudnud logaritmilisse kasvufaasi. Selle vahekasvu jooksul lahjenesid loodetavasti valgud, mille ekspressioon pET plasmiidilt üleöö LB söötmes kasvatades lekkis (Arvi Jõers, avaldamata andmed, TÜTI, Eesti). Seejärel kanti rakud mikrotiiterplaadile LB söötmesse nii, et nende OD₆₀₀=0,0001 ning pET plasmiide sisaldavate tüvede puhul oli kanamütsiini lõppkontsentratsioon söötmes 25 µg/ml. pET plasmiidide induktsiooniks (ning ilma pET plasmiidita tüvede puhul kasvufenotüübi kontrolliks) kasutati erinevaid IPTG (isopropüül-β-tiogalaktoosiid) kontsentratsioone: 0 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM ja 1000 µM. Rakke kasvatati üleöö mikrotiiterplaatide lugejas Synergy MX (BioTek) temperatuuril 30°C ning kultuuride optiline tihedus lainepikkusel 600 nm mõõdeti iga 15 minuti järel. Kõigi tüvede puhul kasutati kaht tehnilist replikaati igal IPTG kontsentratsioonil. Katset korrati kolm korda alustades samast DMSO varulahusest (ingl *stock*) (kolm bioloogilist kordust). Saadud kasvukõverad naturaallogaritmiga, et leida ühtlane kasvukiirus k (logaritmitud kasvukõvera sirge osa tõus). Tehniliste replikaatide

kasvukiirustest võeti aritmeetiline keskmine, seejärel omakorda saadud kolme bioloogilise replikaadi aritmeetiline keskmine. Selle keskmise kasvukiiruse põhjal arvutati iga tüve jagunemiste arv tunnis (j) ühtlase kasvukiiruse puhul ($j=k/\ln 2$) ning selle standardhälve. Jagunemiste arv tunnis j on pöördväärtus rakkude kahekordistumisaegast (ingl *doubling time*). Arvutuste ja jooniste tegemiseks kasutati statistikatarkvara R (R Core Team, 2013).

2.2.5. Ribosomaalse RNA lagundamise uurimise katsesüsteem

Käesolevas töös uuriti ribosoomide lagundamist kahe stressiallika puhul: antibiootikum klooramfenikooli (CAM) poolt põhjustatud stressis ja kuumastressis (45°C).

CAM stressi katsed viidi läbi temperatuuril 30°C, sest eelkatsed on näidanud, et lagunemisefektid on 30°C juures selgemalt jälgitavad kui temperatuuril 37°C. Bakterirakud inokuleeriti üleöö loksutades 37°C juures kasvanud kultuuridest 60 ml LB söötmesse (lahjendus vähemalt 250x), pET plasmide sisaldavate tüvede puhul lisati kanamütsiini (25 µg/ml) ja IPTG (100 µM). Bakterikultuurid kasvatati 30°C juures kiirusel 210 rpm loksutades kuni OD₆₀₀=0,3. Seejärel lisati katsekultuuridele CAM, lõppkontsentratsiooniga 7 µg/ml (Siibak *et al.*, 2009 järgi). Kontrollkultuuridele antibiootikumi ei lisatud. Pärast kaht tundi kasvu fuugiti rakud 50 ml kaupa põhja (fuug 4K15, Sigma, rootor 11150, 2500g, 15 min, +4°C) ning sade suspendeeriti 0,5 ml LP puhvril (selle ja kõigi järgnevate lahuste koostised on ära toodud lisas 3). Rakususpensioonile lisati 1,5 mg lüsotsüümi (Applichem) LP puhvril ja 2,5 U DNAas I (ThermoScientific) ning inkubeeriti 20-30 min jääl. Rakkudele lisati 1 g klaaskuule (d=0,1, BioSpec Products) ning rakud lüüsi toatemperatuuril FastPrep-24 masinaga (MP Biomedicals). Kolme lüüsisükli (kiirus 4 m/s, kestus 1 min) vahele jäeti 5 min pausid, mis on tingitud FastPrep-24 masina iseärasusest. Pauside ajal hoiti proove jääl. Rakulüsaat klaariti, fuugides 15 min kiirusel 13,2 krpm +4°C juures (fuug 5415 R, Eppendorf, rootor F45-24-11). Gradiendisegajaga valmistati 10%→25% sahharoosigradiendid (10% ja 25% sahharoosilahustest 1x LLP-s) ning gradientidele kanti 40 A₂₆₀ ühikut ribosome, gradiendid tasakaalustati 1x LP lahusega. Erinevad ribosoomide osakesed eraldati ultratsentrifuugis Optima L-90K fuugides (Beckman Coulter, rootor SW28, 17 h, 20,4 krpm, +4°C, $\omega^2t=2,8e+11$). Gradientide proovid pumbati (Pump P-1, Amershan Biosciences, kiirus 7) läbi spektrofotomeetri (Econo UV Monitor, BIO-RAD, tundlikkus 0,5), mis tuvastab eri ribosoomiosakeste fraktsioonide erinevad optilised tihedused. Need visualiseeriti ning mõõtmistulemused salvestati DataAcquisition (Indrek Must, Tehnoloogiainstituudi aparatuuriehituse tuumiklabor) programmi abil. Erinevad fraktsioonid (70S, 50S, 30S, lisapartiklid, pinnafraktsioon) koguti ning neid uuriti edasi *Northern blot* meetodil. Antud

katseid korraliti vähemalt kaks korda (välja arvatud WT ja $\Delta ybeY$ + pET-YbeY *Northern blot* analüüsid, mis õnnestusid ühel korral).

Kuumastressi eksperimendid planeeriti Daviese ja kolleegide katseskeemi järgi (Davies *et al.*, 2010). Katse käik oli sarnane CAM stressi katsetele, ent bakterikultuurid kasvatati kuni $OD_{600}=0,3$ temperatuuril 37°C kiirusel 220 rpm raputades ning seejärel viidi üheks tunniks temperatuurile 45°C (raputamise kiirus endiselt 220 rpm). Rakud koguti, lüüsi ja ribosoomide osakesed eraldati ultratsentrifuugimisel samamoodi nagu CAM katsete puhul, ent gradientidele kanti 20-30 A_{260} ühikut ribosoomi. Rakkude kogumisel võeti ka 2 ml rakukultuuri, mille rakud fuugiti põhja (2500x g, 15 min, +4°C, fuug 5415 R, Eppendorf, rootor F45-24-11), suspendeeriti 600 µl 1x TEN puhvril ning rakud lüüsi ja RNA puhastati fenooliga, nagu on kirjeldatud ptk-s 2.2.6, ent fenool (pH=6,0) 1% SDS-s oli soojendatud 65°C-ni ning proove inkubeeriti 5 min 65°C juures, mitte jääl. Saadud RNA eraldati denatureerival geelelektroforeesil (vt ptk 2.2.7.1) ning visualiseeriti Sybr Gold värvi (Life Technologies) abil (10 000x lahjendus MQ vees, inkubatsioon 1 h). Kuumastressi eksperimente korraliti kaks korda, YbeY mutante sisaldavate tüvedega tehti kolm kordust.

2.2.6. Ribosomaalse RNA ettevalmistamine *Northern blot*'i jaoks

Igale ribosoomide fraktsioonile lisati 2,5 mahtu 96% etanooli ning ribosoomidel lasti sadeneda üleöö temperatuuril -20°C. Ribosoomid fuugiti põhja fuugis 4K15 (Sigma, rootor 11150, 45 minutit 4 krpm, +4°C), pesti 10 ml 70% etanooliga ja seejärel fuugiti taas samas fuugis kiirusel 4 krpm 10 minutit. Pärast etanooli eemaldamist suspendeeriti ribosoomid 100 µl MQ vees. rRNA puhastamiseks kasutati kaht alternatiivset meetodit: fenooli ja PM puhvrit (Qiagen). PM puhvril olev kaatroopne sool naatrium-perkloraat denatureerib lahuses olevad valgud ja RNA, sest katkestab vesiniksidemeid, ning isopropanooli abil RNA sadestub.

PM puhvriga puhastamisel lisati ribosoomide proovidele 1 ml PM puhvrit ning neid loksutati väristajal 20 minutit toatemperatuuril. Pärast seda lisati RNA lahusele 20 µl 50% ränioksiidi (Sigma) suspensiooni ning loksutati lahust väristajal veel 10 minutit. Selles etapis seondub RNA räniteradele. Seejärel fuugiti RNA koos oma kandjaga eppendorfi põhja (fuug 5415 R, Eppendorf, rootor F45-24-11, 5 krpm, 15 s, seda fuugi kasutati ka pesemise etapis sademe saamiseks ning RNA eraldamisel ränist), eemaldati veejoapumbaga supernatant ning pesti räni sadet kaks korda 1 ml 70% etanooliga. Sade kuivatati temperatuuril +37°C umbes 5 minuti jooksul. RNA elueerimiseks suspendeeriti kuivanud sade 50 µl MQ vees, hoiti 10 minutit temperatuuril +37°C, fuugiti (2 min, 13,2 krpm), järgmisesse eppendorfi asetati 49 µl supernatanti, fuugiti (2 min, 13,2 krpm) ning võeti üles 48 µl puhast RNA lahust, mis asetati

puhtasse eppendorfi. NanoDrop spektrofotomeetriga (ThermoScientific) mõõdeti RNA lahuse kontsentratsioon (ng/μl).

Fenooliga RNA puhastamisel lisati 100 μl RNAle 60 μl 10x TEN puhvrit (vt lisa 3) ja 440 μl MQ vett ning seejärel 600 μl fenooli (pH=6,0) 1% SDS-s, raputati Vortexil, inkubeeriti 5 min jääl ning fuugiti 10 min kiirusel 13,2 krpm 4°C juures (fuug 5415 R, Eppendorf, rootor F45-24-11) (samad parameetrid ka järgmistel fuugimistel). Proovide vesifaasile lisati 600 μl fenooli ja kloroformi (1:1) segu, raputati Vortexil, fuugiti, eraldati vesifaas. Seda etappi korrati. Pärast seda lisati saadud vesifaasile 500 μl kloroformi, raputati Vortexil ning fuugiti. Eemaldatud vesifaasile (400 μl) lisati 44 μl 3M naatriumatsetaati (pH=5) ning 2,5 ml 96% etanooli (1,1 ml) ning RNAi lasti sadeneda 1-2 tundi -20°C juures. Seejärel proove fuugiti ning sadet pesti 1 ml 70% etanooliga, misjärel fuugiti RNA taas tuubi põhja. Etanool eemaldati ning RNA suspendeeriti 50 μl MQ vees, RNA kontsentratsioon mõõdeti samamoodi nagu PM puhvriga puhastades.

2.2.7. Northern blot

Northern blot on meetod konkreetsete RNA molekulide tuvastamiseks kogu RNA hulgast. Uuritavad RNA molekulid muutuvad nähtavaks, kui spetsiifilised oligonukleotiidid nendega hübridiseeruvad. See toimub tänu oligonukleotiididele lisatud ühenditele, mis võimaldavad neid tuvastada fluorestsentsi või kemoluminestsentsiga. Pärast RNA elektroforeesi denatureerivates tingimustes kantakse RNA geelilt üle nailonmembraanile. Oligonukleotiididega hübridiseerides on võimalik tuvastada membraanile seotud RNA molekulide suurus, sest vastavalt oma pikkusele on erinevad RNA molekulid geelil erinevale kaugusele liikunud. Antud töös on kasutatud modifitseeritud Northern bloti protokoll, mis on välja töötatud Kasari ja kaasautorite poolt Trayhurni ja kolleegide järgi (Kasari *et al.*, 2010; Trayhurn *et al.*, 1994).

2.2.7.1. Geelelektroforees

Geelelektroforeesil kasutati 1,5% denatureerivat agarosgeeli 1x MOPS puhvris (vt lisa 3) ja 2% formaldehüüdis. Proovidele (1,5-3 μg RNA-d 6,6 μl-s) lisati 5,4 μl formaldehüüdi, 3 μl 10x MOPS puhvrit ja 15 μl formamiidi, mille mõjul RNA denatureerub, ning denaturatsiooni soodustamiseks inkubeeriti proove 15 minutit 55°C juures. Seejärel asetati need otse jääle, et takistada sekundaarstruktuuride taasmoodustumist, ning lisati 6 μl värvi Bromophenole Blue Agarose Dye (1:6) (0,25% bromofenoolsinine ja 40% sahharoos). Ka markerid RiboRuler High Range RNA Ladder ja RiboRuler Low Range RNA Ladder (Thermo Scientific) valmistati samamoodi ette, kuid kogused olid kolmandiku võrra väiksemad. Elektroforeesi

puhvrina kasutati 1x MOPS puhvrit. Elektroforeesi esimese tunni jooksul oli pinge 60 V ning seejärel 85 V.

2.2.7.2. RNA ülekanne membraanile

10x SSC lahust (vt lisa 3) sisaldava klaaskausi peale asetati klaasplaat ning selle peale kaks Whatman 3M paberi riba. Nende ribade otsad ulatusid 10x SSC lahusesse ning nende laius oli suurem kui geeli laius. Geelist lõigati välja proove sisaldav osa ning markereid sisaldav osa. Viimast neist inkubeeriti 1 h 50 ml Sybr Gold (Invitrogen) värvi lahuses (17 000x lahjendus) MQ vees loksutades, et markereid UV valguses visualiseerida. Proove sisaldavat geeli loputati 15 min MQ vees ning seejärel 2x 5 minutit 10x SSC lahuses. Geel asetati tagurpidi Whatmani paberi ribadele ning selle peale pandi eelnevalt geeli suuruses välja lõigatud positiivselt laetud nailonmembraani (Roche) tükk ja kaks Whatman paberi tükki, mis olid esmalt kastetud MQ vette ja seejärel 10x SSC lahusesse. Geeli ümbrus kaeti kilega, et vältida 10x SSC lahuse aurumist. Pealmisele Whatman paberile asetati umbes 7-8 cm paksune ühtlane paberrätikute kiht, klaasplaat ning mõnesajagrammine raskus. RNA kandus geelilt üle membraanile üleöö kapillaarjõudude mõjul. RNA seondus membraanile UV kiirguse mõjul masinas UV Stratalinker 1800 (Stratagene)(Autocrosslink programm).

2.2.7.3. Hübridisatsioon

Membraani prehübridisatsioon (ilma oligonukleotiidideta) toimus 40 ml hübridisatsioonipuhvris (vt lisa 3) temperatuuril 62°C 3 tunni jooksul hübridiseerimismasinas Hybrigen (Techne). Seejärel lisati oligonukleotiidid (Fluo oligonukleotiide 100 pmol ja Cy5 oligonukleotiide 50 pmol) ning nende hübridisatsioon toimus üleöö 62°C juures. Korraga hübridiseeriti sama rRNA molekuli eri järjestustele seonduvad Fluo ja Cy5 oligonukleotiidid, nii et need ei konkureerinud seondumisel.

2.2.7.4. Membraani pesu

Membraani pesu toimus kolm korda 5 minuti jooksul 250 ml-s pesupuhvris (vt lisa 3) 43°C juures. Seejärel visualiseeriti RNA Typhooni abil (vt ptk 2.2.8.). Pärast seda loputati membraan 30 sek jooksul 1x MAB+Tween lahusega ning membraan loksus 1x MAB+Block lahuses (vt lisa 3) 1,5 tundi, misjärel lisati lahusele 2,25 U Anti-Fluorescein-AP Fab Fragments antikeha (Roche), millele on konjugeeritud aluseline fosfataas. Membraani inkubeeriti antikeha juuresolul 30 min. Membraan pesti üleliigsest antikehast puhtaks 50-100 ml loputuse ja kahekordse 20-minutiline pesuga 1x MAB+Tween lahuses (u 250 ml). CDP-Star kemoluminestsentse substraadiga (Sigma) töötluste jaoks õige pH saavutamiseks leotati membraani 3 min 100 ml 1x detektsioonipuhvris (vt lisa 3).

2.2.8. Signaali detektsioon

Membraani inkubeeriti CDP-Star kemoluminestsentse substraadiga (1-1,5 ml) 15 min kile vahel. Sel ajal lõikab aluseline fosfataas CDP-Star substraati, mille tulemusena tekib valgus, mida on võimalik salvestada pilti filmile ilmutades.

Cy5 oligonukleotiidid, mis olid hübridiseerunud RNAle membraanil, eraldasid fluorestsentsvalgust, mida oli võimaline detekteerida Typhoon TRIO (Amersham Biosciences). Tulemuseks oli digitaalne pilt.

Erinevaid detektsioonimeetodeid ja oligonukleotiide kasutati selleks, et saada parem pilt ribosoomide lagundamise kohta. Filmile ilmutamine on väga tundlik meetod – piisavalt pika ilmutamisaja jooksul on näha ka väiksemad kogused uuritavat RNAd. Ent pika ekspositsioonaja korral võib tugevamate vöötide signaal üle võimenduda ja siis väheneb lähedaste vöötide eristatavus. Samas ei ole nõrgemad vöödid digitaalsel detektsioonil mõnikord eristatavad. 23S rRNA tuvastamiseks kasutati paralleelselt 23S-190-Cy5 ning 23S-h25-Fluo oligonukleotiide. 16S rRNA tuvastamiseks kasutati paralleelselt EUB338-Cy5 ning 16S-1220-Fluo oligonukleotiide.

2.2.9. Membraani puhastamine oligonukleotiididest

Enne membraani järgmist hübridisatsiooni teiste oligonukleotiididega peab selle eelmistest puhastama. Selleks lisati membraanile 250 ml keevat puhastuslahust (vt lisa 3) ning loksutati selles 10 minutit. Seda tehti kokku kaks korda. Pärast MQ veega loputamist võis membraani uuesti prehübridiseerida ning edasisi etappe korrata. Vajadusel võis aga membraani talletada kilekaante vahele suletuna 10x SSC lahuses +4°C juures tulevaseks kasutamiseks.

2.2.10. WT ja $\Delta ybeY$ tüvede kasvukiiruste ühtlustamine

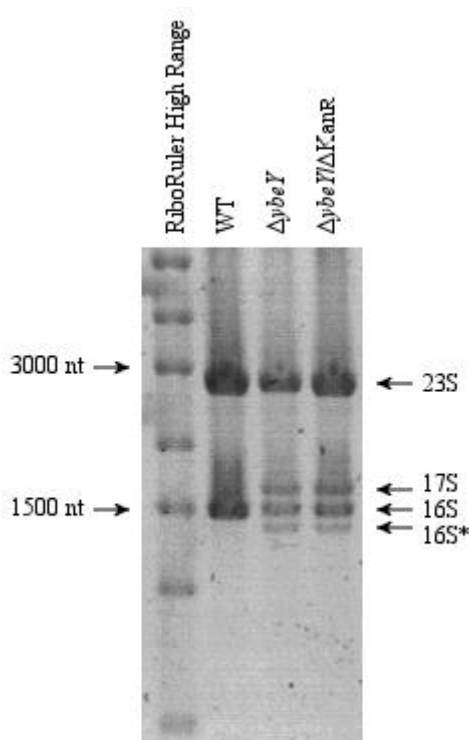
Selleks, et saavutada $\Delta ybeY$ tüves sama kõrge kasvukiirus, kui on WT tüvel 30°C juures, ning aeglustada WT tüve kasv $\Delta ybeY$ tüve oma tasemeni 30°C juures, kasvatati WT tüve 25°C juures ning $\Delta ybeY$ tüve 37°C juures. Üleöökuultuurist tehti 250x lahjendus 400 ml LB söötmesse ning mõõdeti kasvukõverad, mõõtes kultuuride optilist tihedust lainepikkusel 600 nm iga poole tunni tagant. Kasvukõvera punktidest võeti naturaallogaritm ning leiti ühtlane kasvukiirus k (saadud sirge tõus). Keskmise kasvukiirus leiti WT ja $\Delta ybeY$ tüvede puhul temperatuuril 30°C kahe eksperimendi keskmisena, WT tüvel 25°C juures kasvades kolme eksperimendi ja $\Delta ybeY$ tüve 37°C juures kasvades nelja eksperimendi keskmisena.

WT ja $\Delta ybeY$ värsketelt plaatidelt inokuleeriti kolooniad katseklaasidesse, mis sisaldasid 3 ml LB söödet ning neid kasvatati 37°C juures loksutil üleöö. Üleöökuultuurist tehti 250x lahjendus

400 ml LB söötmesse ning neid kasvatati eelmainitud temperatuuridel, kuni nende $OD_{600}=0,3$. Seejärel lisati mõlemast tüvest ühele kultuurile klooramfenikooli ($7 \mu\text{g/ml}$) ning kontrollkultuur kasvas edasi ilma antibiootikumi juuresoluta söötmes. Kultuure kasvatati veel 2 tundi 30°C juures; seejärel lisati söötmesse jääd, et see võimalikult kiiresti jahtuks ning ribosoomide hetkeolukord säiliks, ja rakud fuugiti 10 minuti jooksul 5 krpm kiirusel fuugis RC5B Plus (Sorvall, rootor SLA-1500) põhja. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 17 ml lüüsipuhvris (LP puhver, vt lisa 3) ning lüüsi rõhu abil masinaga MicroFluidizer EmulsiFlex C3 (Avestin). Seejärel fuugiti lüsaate 30 minuti jooksul 13 krpm kiirusel fuugis RC5B Plus (Sorvall, rootor SS-34), et need klaaruksid. 10%→25% sahharoosigradientidele lisati 50 U A_{260} ühikut ribosoomi ning ribosoomiosakesed eraldati ultratsentrifuugimisel ja tuvastati nii, nagu on kirjeldatud ptk-s 2.2.5. Seda katset korrati kaks korda.

2.3. Tulemused

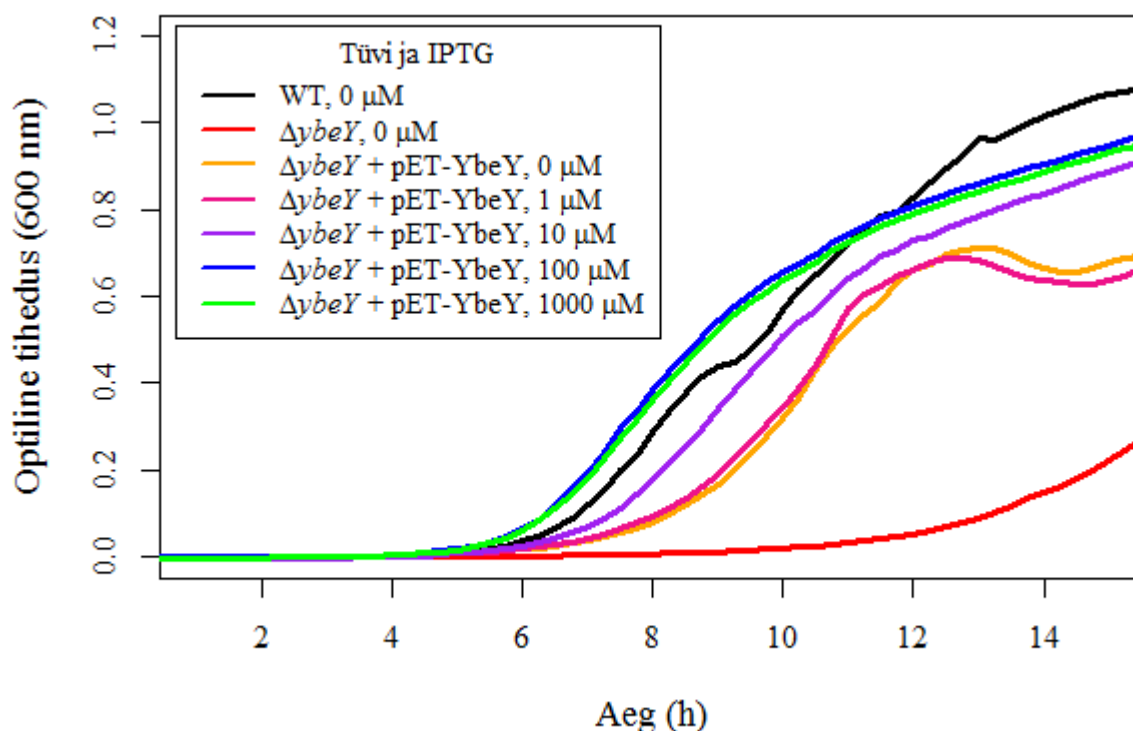
YbeY inaktiivsete mutantide loomiseks katsetasin esmalt rekombineeringu strateegiat (Ellis *et al.*, 2001) selleks, et muteerida vajalikud koodonid *E. coli* genoomis. Selle lähenemise eeliseks oleks olnud mutantsete YbeY valkude natiivne regulatsioon ja ekspressioon. Kahjuks ei suutnud ma saavutada piisavalt kõrget rekombineeringu efektiivsust, et neid mutante tuvastada, mistõttu genoomse *ybeY* geeni muutmine ebaõnnestus. Selle asemel konstrueerisin $\Delta ybeY$ tüvele sobilikud komplementatsiooniplasmiidid. Ekspressioonisüsteemiks valisin tac promootori, sest seda on võimalik IPTG kontsentratsiooniga reguleerida. Konstrueerisin ja valideerisin plasmiidid pET-YbeY, pET-YbeY_H114A ja pET-YbeY_R59A. Selleks, et pET plasmide saaks $\Delta ybeY$ tüves kanamütsiini abil selekteerida, tuli eemaldada WT tüvega isogeense $\Delta ybeY$ tüve valmistamisel *ybeY* geeni otste vahele jäänud kanamütsiini resistentsusmarker (Kan^R). Jooniselt 5 on näha, et Kan^R eemaldamisel säilis $\Delta ybeY$ tüvele iseloomulik 16S rRNA protsessimise fenotüüp, sest esinesid nii 17S, 16S kui ka 16S* rRNA molekulid. WT tüves domineeris aga 16S rRNA ning 16S* molekuli ei esinenud üldse. Edaspidi nimetan katseteks välja valitud $\Delta ybeY/\Delta Kan^R$ tüve lihtsuse huvides samuti $\Delta ybeY$ tüveks.



Joonis 5. rRNA protsessimise fenotüüp erinevates tüvedes. RNA eraldati 3 ml 37°C juures kasvanud üleöökuultuurist kuuma fenooliga ning visualiseeriti 1,5% denatureerival agarosgeelil.

2.3.1. pET-YbeY komplementatsiooniks piisab 100 μ M IPTG induktsioonist

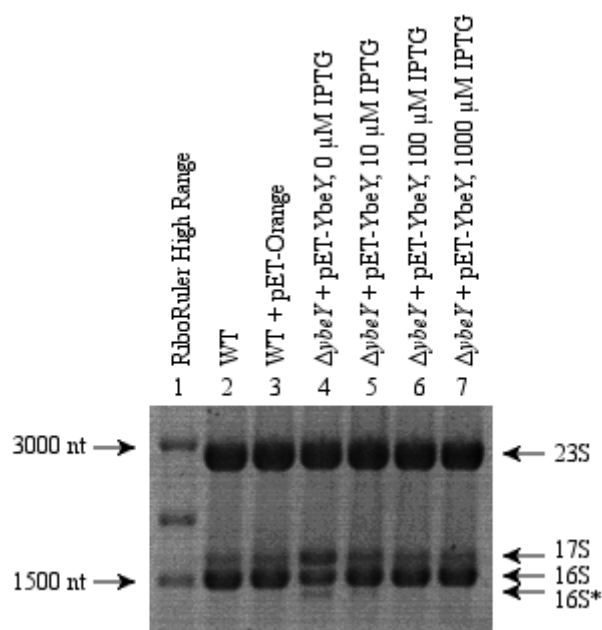
Selles töös eeldasin, et minimaalne YbeY ekspressioonitase, mis tagab WT tüvega sarnase kasvu, on lähedane YbeY natiivsele ekspressioonitasemele. Sellise minimaalse ekspressioonitaseme leidmiseks kasvasin $\Delta ybeY$ + pET-YbeY tüve erinevatel IPTG kontsentratsioonidel temperatuuril 30°C, nagu näidatud joonisel 6. On näha, et isegi IPTG induktsiooni puudumisel toimub $\Delta ybeY$ + pET-YbeY kasv kiiremini kui $\Delta ybeY$ tüves. Tõenäoliselt on põhjuseks ekspressiooni lekkimine *tac* promootorilt.



Joonis 6. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY tüve kasvukõverad temperatuuril 30°C erinevatel IPTG kontsentratsioonidel LB söötmes. Kontrollidena on näidatud ka WT ja $\Delta ybeY$ tüve kasvukõverad IPTG puudumisel. Katse algab nullpunktis rakkude, mis on 37°C juures paari tunni jooksul eksponentsiaalsesse kasvufaasi kasvatatud, lahjendusest ($OD_{600}=0,0001$). Katset korrati kolm korda ning joonisel on näidatud ühe representatiivse eksperimendi tulemused. x-teljel on aeg tundides, y-teljel optiline tihedus mõõdetuna lainepikkusel 600 nm.

Jooniselt 6 on näha, et $\Delta ybeY$ + pET-YbeY tüve kasv 1 μ M IPTG induktsioonil on samaväärne IPTG induktsiooni puudumisega. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY kasvukõver hakkab lähenema WT kasvukõverale alles 10 μ M IPTG induktsioonil ning $\Delta ybeY$ + pET-YbeY saavutab WT tüvega sama kiire või isegi kiirema kasvu 100 ja 1000 μ M IPTG induktsiooni puhul. Nendest tulemustest nähtub, et kasvufenotüübi komplementatsioon toimub täielikult alles 100 μ M IPTG induktsiooni puhul.

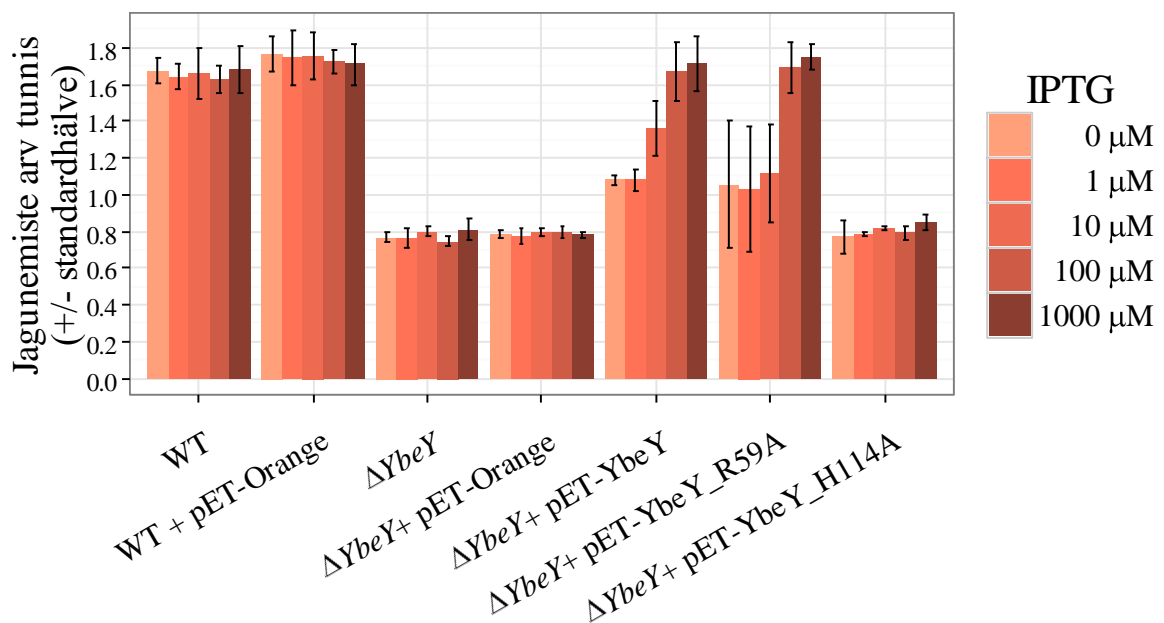
Kontrollimaks, kas antud induktsioonitaseme juures taastub ka WT tüvele omane rRNA protsessimise fenotüüp, eraldasini eri IPTG induktsioonil kasvatatud rakkudest kuuma fenooliga RNA ja visualiseerisin selle denatureerival geelil. Joonise 7 6. rajal on näha, et 100 μ M IPTG induktsioonil on kadunud kogu 16S* ning rRNA profiil sarnaneb WT rRNA profiilile. Nagu näha rajalt 3 (joonis 7), siis pET plasmidi olemasolu iseenesest ei mõjuta rRNA profiili. Seega on 100 μ M IPTG induktsiooni kasutamine edasistes eksperimentides täiesti õigustatud, sest YbeY ekspressioonist piisab nii kasvu kui ka rRNA protsessimise fenotüübi täielikuks komplementatsiooniks.



Joonis 7. rRNA profiilid $\Delta ybeY$ + pET-YbeY tüves sõltuvalt IPTG induktsiooni tasemest. Kontrollina on toodud ka WT ja WT + pET-Orange rRNA profiilid. Rakud inokuleeriti DMSO varulahusest 60 ml LB söötmesse ning kasvatati kuni $OD_{600}=0,3$, misjärel eraldati 3 ml kultuurist kuuma fenooliga RNA ja see visualiseeriti 1,5% denatureerival agarosgeelil.

2.3.2. YbeY mutandid komplementeerivad kasvudefekte erinevalt

Peale $\Delta ybeY$ + pET-YbeY mõõtsin ka WT, WT + pET-Orange, $\Delta ybeY$, $\Delta ybeY$ + pET-Orange, $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_R59A ja $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A tüvede kasvukõverad. Esmane eesmärk oli kirjeldada, kuidas suudavad YbeY ensümaatilistelt inaktiivsed mutandid $\Delta ybeY$ kasvudefekte parandada. Peale selle soovisin kontrollida, kas pET-plasmidi olemasolu ning IPTG kontsentratsiooni suurendamine võivad iseenesest kasvukiirust mõjutada. Kasvukõverate konstantse kasvukiirusega piirkondade põhjal leidsin jagunemiste arvu tunnis, mis on kujutatud joonisel 8.



Joonis 8. Eri tüvede kasvukiiruste võrdlus IPTG kontsentratsiooni kasvades. Kasvukõverad mõõdeti temperatuuril 30°C, ajapunktid võeti iga 15 minuti tagant. Igas katses kasutati kõigi tüvede puhul kaht tehnilist replikaati igal IPTG kontsentratsioonil. Katset korraldati kolm korda. Saadud kasvukõverad naturaallogaritmide, et leida ühtlane kasvukiirus k (logaritmitud kasvukõvera sirge osa tõus). Tehniliste replikaatide kasvukiirustest võeti aritmeetiline keskmine, seejärel omakorda saadud kolme bioloogilise replikaadi aritmeetiline keskmine. Selle keskmise kasvukiiruse põhjal arvutati iga tüve jagunemiste arv tunnis (j) ühtlase kasvukiiruse puhul ($j = k / \ln 2$) ning selle standardhälve. x-teljel on erinevad tüved erinevatel IPTG kontsentratsioonidel, y-teljel on rakkude jagunemiste arv tunnis (+/- standardhälve).

Jooniselt 8 on näha, et IPTG kontsentratsiooni suurendamine ei mõjuta WT ja $\Delta ybeY$ tüvede kasvu. Seega ei ole põhjust arvata, et see iseenesest mõjutaks kasvu ka teistes tüvedes, ning võib järeldada, et nähtavad kasvuefektid tulenevad IPTG induksiooni mõjust. Ka kontrollplasmidi pET-Orange, mis ei kodeeri ühtegi YbeY valku, lisamine WT ja $\Delta ybeY$ tüvedesse ei muuda oluliselt rakkude jagunemiste arvu tunnis ühegi IPTG kontsentratsiooni puhul. Nagu juba joonisel 6 näidatud kasvukõverate puhul, on ühtlase kasvukiiruse puhul $\Delta ybeY + pET-YbeY$ tüve kasv võrreldav WT kasvuga alates 100 μM IPTG induksioonist. Huvitaval kombel mõjub IPTG kontsentratsiooni tõus aga erinevalt inaktiivseid YbeY mutante (YbeY-R59A ja YbeY-H114A) sisaldavatele $\Delta ybeY$ tüvedele. $\Delta ybeY + pET-YbeY_H114A$ tüvi ei hakka IPTG kontsentratsiooni tõustes kiiremini kasvama ning seega käitub sarnaselt $\Delta ybeY$ tüvele. Näib, et histidiini triaadi kuuluv aminohappejääk H114 on oluline metsiktüüpi kasvu tagamiseks. See-eest $\Delta ybeY + pET-YbeY_R59A$ tüve jagunemiste arv tunnis tõuseb 100 μM IPTG induksioonil WT tüvega võrreldavale tasemele. Selles suhtes on komplementatsioon mutantse YbeY-R59A valguga väga sarnane komplementatsioonile

metsiktüüpi YbeY valguga. Seetõttu võib arvata, et R59 jäagist tulenev endoribonukleasne aktiivsus pole metsiktüüpi kasvuks vajalik.

2.3.3. $\Delta ybeY$ translatsiooni ja ribosoomide kokkupaneku defektid ei sõltu kasvukiirusest

Klooramfenikooli töötlusel (7 $\mu\text{g/ml}$) tekivad WT tüves ribosoomide lisapartiklid, sest r-
valkude sünteesil kaob tasakaal ning need ei seonu ribosoomide kokkupaneku
intermediaatidele normaalse stõhhiomeetriaga (Siibak *et al.*, 2011). Oma bakalaureusetöös
„Ribonukleaaaside RNAas R ja YbeY rollist ribosoomide lagundamisel *Escherichia coli*’s“
(Hausenberg, 2014) leidsin, et $\Delta ybeY$ tüves ei teki klooramfenikooli töötluse korral
ribosoomide lisapartikleid nagu WT tüves. Nende tüvede kasvukiiruste erinevuse tõttu tekkis
aga hüpotees, et see erinevus võib tuleneda $\Delta ybeY$ tüve aeglasemast kasvukiirusest, mitte
YbeY valgu puudumisest. Selle hüpoteesi kontrollimiseks aeglustasin WT tüve kasvu nii
palju, et see sarnaneks $\Delta ybeY$ tüve kasvuga 30°C juures ning vastupidi, $\Delta ybeY$ tüve
kasvukiirust tõstsin WT kasvukiiruse tasemeni 30°C juures. Sellised kasvukiirused saavutasin
WT tüve temperatuuril 25°C kasvatades ning $\Delta ybeY$ tüve 37°C juures kasvatades (vt tabel 11).

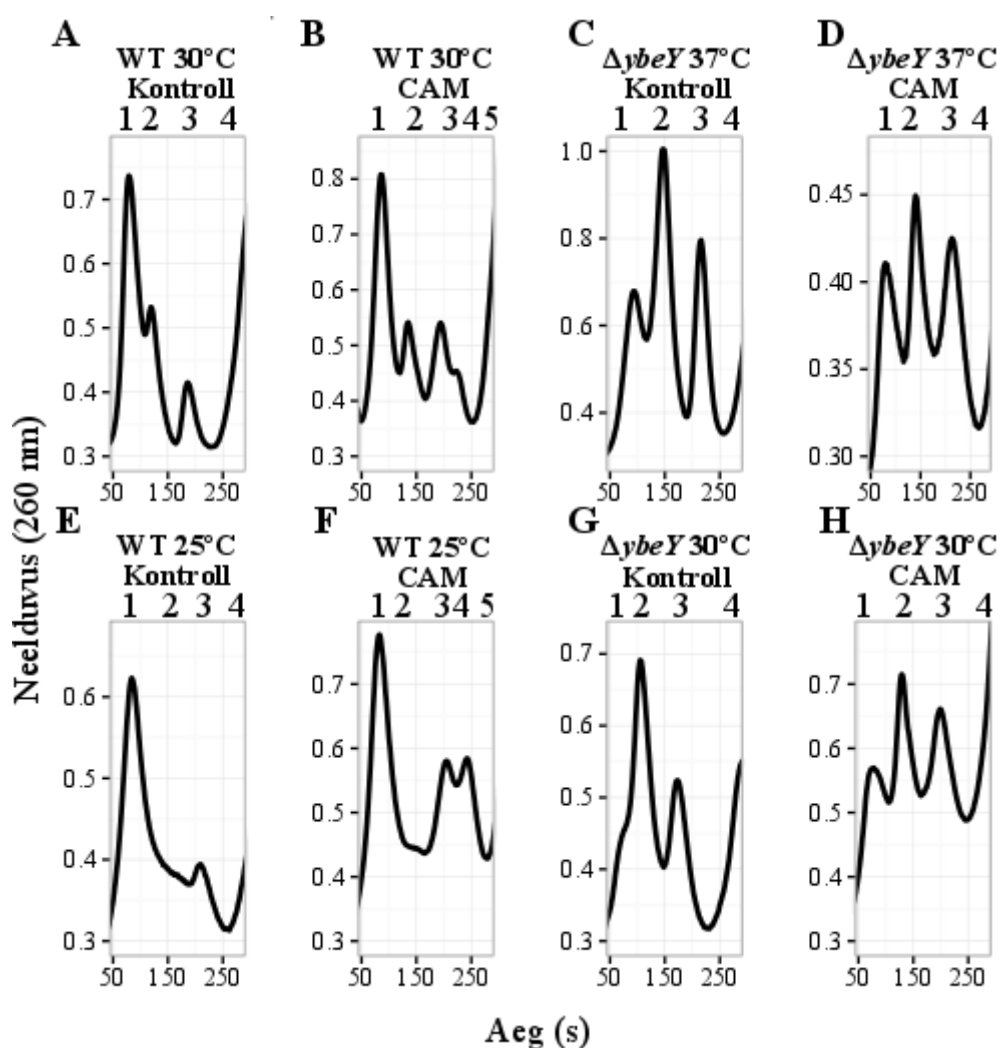
Tabel 11. WT ja $\Delta ybeY$ tüvede kasvukiirused eri temperatuuridel. Kultuure kasvatati 400 ml
LB söötmes erinevatel temperatuuridel ning nende OD₆₀₀ määrati iga poole tunni tagant.
Saadud kasvukõverad naturaallogaritmiga, et leida ühtlane kasvukiirus k (logaritmitud
kasvukõvera sirge osa tõus) ja selle standardhälve.

Tüvi ja temperatuur	Keskmine kasvukiirus	Standardhälve
WT 25°C	0,62	0,05
WT 30°C	0,97	0,07
$\Delta ybeY$ 30°C	0,56	0,03
$\Delta ybeY$ 37°C	0,86	0,06

Joonisel 9 on ülemises reas kõrgema kasvukiirusega kasvanud rakkudest ning alumises reas
madalama kasvukiirusega kasvanud rakkudest eraldatud ribosoomide profiilid. WT tüve
aeglasema kasvu puhul 25°C juures (paneelid E ja F) sarnanesid tulemused 30°C juures
kasvanud WT rakkude ribosoomide profiilidele (A ja B). Ilma antibiootikumita
kontrollkultuurides (paneelid A ja E) esineb enamik ribosoomiosakesi 70S ribosoomidena
(igal paneelil piik 1) ning vabu 50S ja 30S alamühikuid on vähem (vastavalt piigid 2 ja 3).
CAM töötluse puhul (paneelid B ja F) tekivad ribosoomide lisapartiklid (piigid 3 ja 4
paneelidel B ja F) mõlema kasvukiiruse korral. $\Delta ybeY$ tüvele iseloomulik 70S ribosoomide
(piigid 1) vähesus ning vabade 50S ja 30S alamühikute (piigid 2 ja 3) rohkus on näha $\Delta ybeY$
tüve ilma antibiootikumita kontrollkultuurides nii temperatuuril 30°C kui ka 37°C (paneelid C

ja G). Paneelil G ei ole 70S ribosoomid (piik 1) 50S alamühikutest (piik 2) sahharoosigradiendis eriti hästi eraldunud. Kummalgi temperatuuril kasvades ei teki $\Delta ybeY$ tüves CAM lisamisel lisapartikleid nagu WT tüves, vaid alles jäävad 50S ja 30S alamühikud (piigid 2 ja 3), mida leidub rohkem kui 70S ribosoomide (piik 1). Samas näib, et kiirema kasvu korral on $\Delta ybeY$ tüves 70S ribosoomide võrreldes 50S alamühikute hulga veidi rohkem kui 30°C juures (võrdle paneelide D ja H piike 1 ja 2).

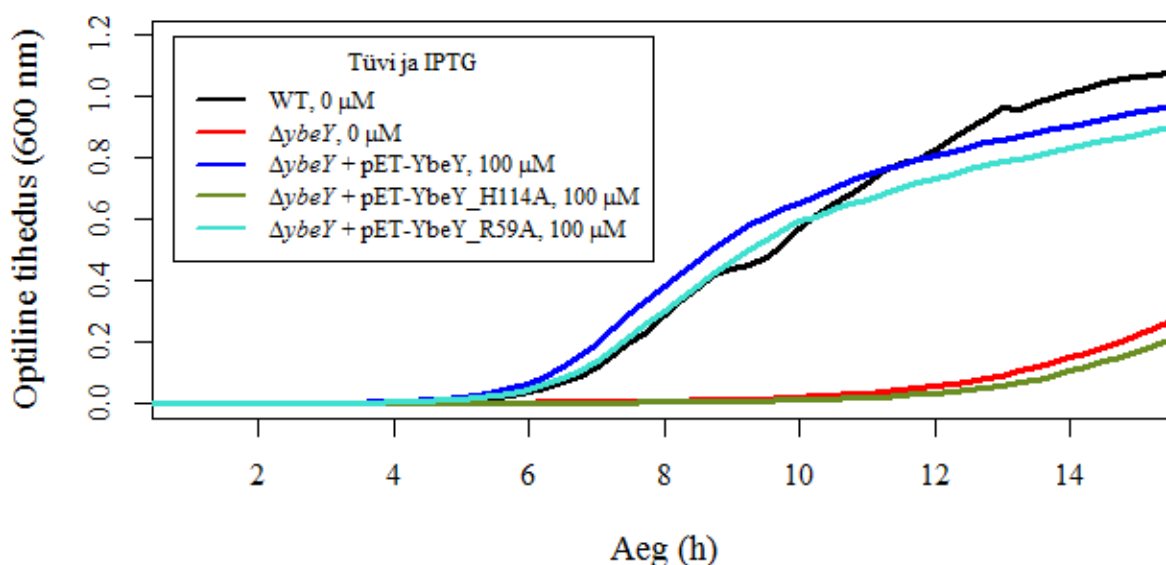
Nende tulemuste põhjal ei saa väita, et kasvukiirus mõjutaks ribosoomide kokkupanekut ja ribosoomide lisapartiklite teket CAM töötamise korral. Seega tuleneb lisapartiklite puudumine $\Delta ybeY$ tüves CAM juuresolul arvatavasti siiski YbeY puudumisest ning selle mõjust ribosoomide kokkupanekule.



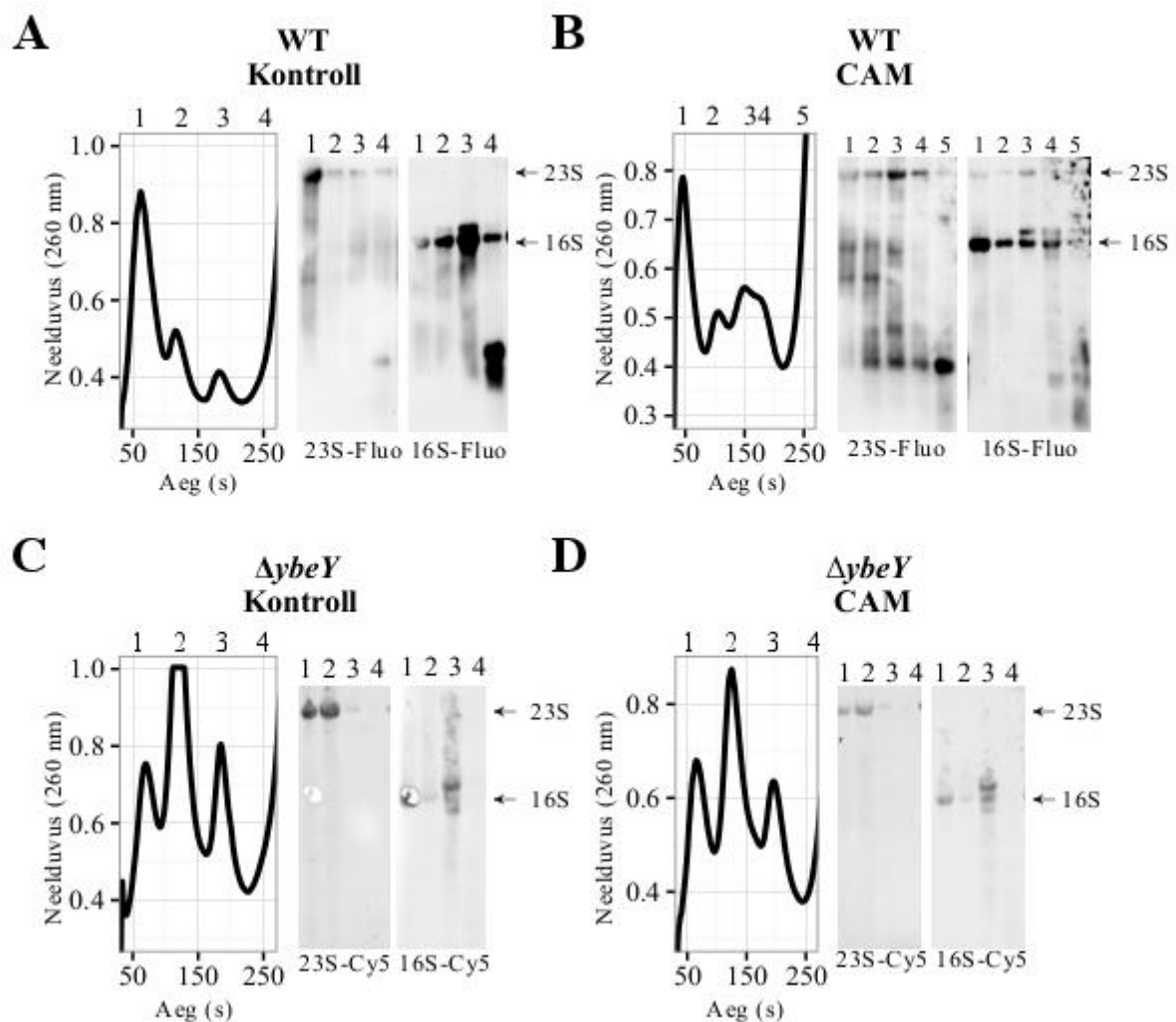
Joonis 9. Ribosoomide profiilid WT ja $\Delta ybeY$ tüvedest erinevatel temperatuuridel erinevatel kasvukiirustel. 10%→25% sahharoosigradiendile kanti 50 A_{260} ühikut ribosoomide. x-teljele on märgitud gradientide mahavõtmise aeg sekundites ning y-teljele ribosoomiosakeste neelduvus lainepikkusel 260 nm.

2.3.4. YbeY mutantide rRNA ja ribosoomide profiilid erinevad CAM stressis

Kuna $\Delta ybeY$ tüve täielikuks komplementatsiooniks metsiktüüpi YbeY valguga piisab 100 μM IPTG induktsioonist, kasutasin klooramfenikooli stressi katsetes pET komplementatsiooniplasmiide sisaldavates tüvedes universaalselt seda IPTG kontsentratsiooni. CAM stressi katsetes kasutatud tüvede kasvukõverad, mõõdetuna Synergy MX mikrotiiterplaatide lugejaga antud katsetingimustel (LB sööde, 30°C, pET plasmiide sisaldavate tüvede puhul 100 μM IPTG induktsioon ja 25 $\mu\text{g/ml}$ Kan, kontrolltüvede WT ja $\Delta ybeY$ IPTG ja Kan puudumine) on ära toodud joonisel 10. Järgnevate tulemuste tõlgendamisel tuleb meeles pidada seda, et 100 μM IPTG induktsioonil ei muutunud $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A tüve kasv sarnaseks WT tüvega (nagu $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_R59A tüve kasv), vaid selle tüve kasv meenutas antud katsetingimustel $\Delta ybeY$ tüve kasvu (vt joonis 10). Kuigi joonisel 10 toodud kasvukõverad on mõõdetud mikrotiiterplaadil, mitte kolvis, nagu viidi läbi CAM stressi katsed, olid nende tüvede kolvis mõõdetud kasvukõverad mikrotiiterplaadil mõõdetud kasvukõveratele sarnased (andmed pole esitatud). Mikrotiiterplaadil mõõdetud optiliste tiheduste nominaalväärtused ei vasta kolvis mõõdetud optiliste tiheduste väärtustele.



Joonis 10. CAM stressi katsete jaoks valitud tüvede kasvukõverad 30°C juures LB söötmes. pET plasmiide sisaldavate tüvede puhul viidi läbi 100 μM IPTG induktsioon, kontrolltüvede WT ja $\Delta ybeY$ puhul IPTG-d ei lisatud. Kasvukõverate mõõtmine algab null ajapunktis rakkude, mis on 37°C juures paari tunni jooksul eksponentsiaalsesse kasvufaasi kasvatatud, lahjendusest ($\text{OD}_{600}=0,0001$). Pildil olevad kasvukõverad on representatiivsed kolme bioloogilise korduse suhtes. x-teljel on aeg tundides, y-teljel optiline tihedus mõõdetuna lainepikkusel 600 nm.



Joonis 11. WT ja $\Delta ybeY$ tüvede ribosoomide ja rRNA profiilid kontrollkultuurides ja CAM töötusel (7 $\mu\text{g/ml}$) 30°C juures LB söötmes. 40-50 A_{260} ühikut ribosome eraldati 10% → 25% sahharoosigradiendil, RNA visualiseeriti *Northern blot* meetodil. Selleks kasutatud oligonukleotiidid on joonisel tähistatud järgnevalt: 23S-h25-Fluo - 23S-Fluo; 16S-1220-Fluo - 16S-Fluo; 23S-190-Cy5 - 23S-Cy5; EUB338-Cy5 - 16S-Cy5. Igal paneelil vastavad ribosoomi profiilide piikide numbrid rRNA profiilide fraktsioonide numbritele. Ribosoomide profiilide x-teljele on märgitud gradientide mahavõtmise aeg sekundites ning y-teljele ribosoomiosakeste neelduvus lainepikkusel 260 nm.

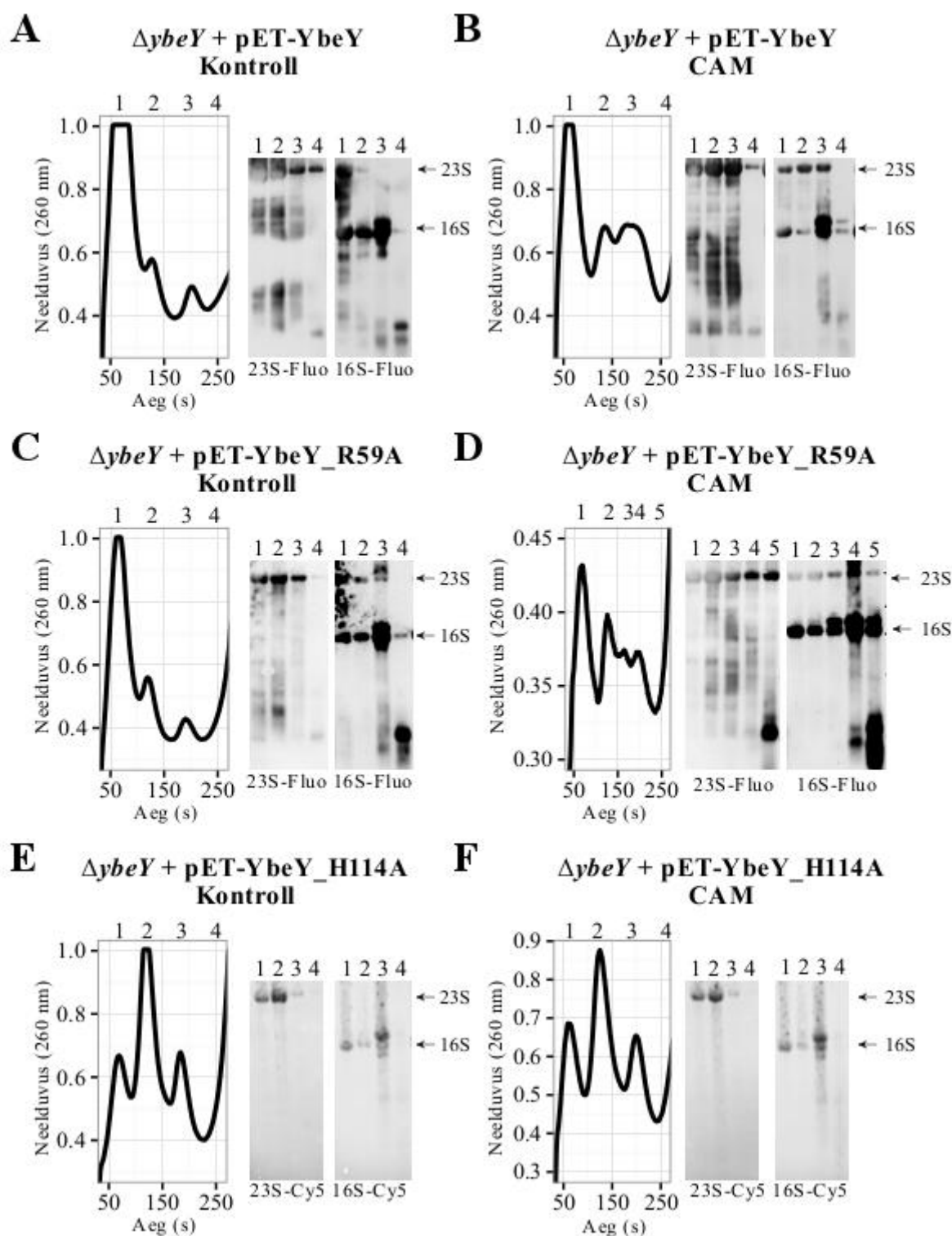
Erinevate lüüsimetoditega lüüsitud WT ja $\Delta ybeY$ rakkudest pärit ribosoomide profiilid sarnanevad 30°C juures (võrdle jooniseid 9 ja 11). Kontrollkultuuride puhul (joonis 11 paneelid A ja C) ja $\Delta ybeY$ tüve CAM töötuse korral (joonis 11, paneel D) tähistab piik 1 70S ribosome, piik 2 50S alamühikuid, piik 3 30S alamühikuid ja piik 4 pinnafraktsiooni. WT tüve CAM töötuse korral (joonis 11, paneel B) kuuluvad piiki 1 70S ribosoomid, piiki 2 50S ribosoomid, piikidesse 3 ja 4 ribosoomide lisapartiklid ning piiki 5 pinnafraktsioon. Joonise 11 igal paneelil on ribosoomide profiili piikide numbrid ja rRNA profiilide fraktsioonide numbrid vastavuses. Vasakpoolsetel rRNA profiilidel on kasutatud rRNA tuvastamiseks 23S

rRNAGA komplementaarset oligonukleotiidi, parempoolsetel 16S rRNAGA seonduvat oligonukleotiidi.

Kontrollkultuuride ribosoomide profiilide (joonis 11, paneelid A ja C) võrdlemisel on näha, et *ΔybeY* tüves on vähem 70S ribosoomi ja rohkem vabu 50S ja 30S alamühikuid kui WT tüves. Seejuures esineb *ΔybeY* tüves alati vabu 30S alamühikuid vähem kui 50S alamühikuid, kuid 30S alamühikute hulk 70S ribosoomide suhtes kõigub: mõnikord esineb neid veidi rohkem, teine kord veidi vähem. rRNA profiilid neis tüvedes erinevad (paneelid A ja C). WT tüve (paneel A) 30S alamühikutes (3. fraktsioonis) on tuvastatav 16S rRNast suurem rRNA molekul, mis on arvatavasti selle eellane 17S rRNA. 2. fraktsioonis, kuhu peaksid kuuluma 50S alamühikud, on geelile kantud vähem RNAd ning 16S rRNA, mis seal nähtav on, on arvatavasti kandunud üle 70S fraktsioonist (1), sest 70S ja 50S pole suudetud gradiendil täielikult eraldada. Peale selle on pinnafraktsioonis (4) näha lühemaid 16S rRNA tükke, mis on tõlgendatavad kui 16S rRNA laguproduktid. Ka *ΔybeY* tüve (paneel C) 30S alamühikutes (3. fraktsioonis) on näha 17S ja 16S rRNA, aga lisaks sellele ka 16S rRNast lühemat rRNA molekuli, mis on tõenäoliselt *ΔybeY* tüvele iseloomulik 16S* rRNA. Sellel *ΔybeY* tüve rRNA profiilil pole ei 23S ega 16S laguprodukte, ent varasemalt teistsuguse lüüsimetodiga läbi viidud katsetes on märgatud vähesel määral laguprodukte ka seal (vt lisa 4).

CAM (7 µg/ml) lisamisel söötmesse tekivad WT tüves (paneel B) ribosoomide lisapartiklid (piigid 3 ja 4), mis sisaldavad nii 23S kui 16S rRNAd, nende laguprodukte ja 16S rRNA eellasmolekuli 17S. Kuna neid lisapartikleid pole õnnestunud teineteisest täielikult eraldada, on keeruline öelda, millised komponendid kummalegi neist iseloomulikumad on. Võrreldes kontrollkultuuriga näib CAM juuresolul 23S rRNA lagundamine mõõdukalt määral rohkem toimuvat, eriti on nähtav väikeste laguproduktide olemasolu kõigis fraktsioonides peale esimese (paneel B). Kuigi paneelil A on 16S rRNA laguproduktid tugevamalt nähtavad, on geelil ka rohkem RNAd kui paneelil B ning seetõttu näib, et lagunemise efektid 16S puhul on kontrollkultuuris ja CAM töötamise puhul sarnased.

ΔybeY tüve ribosoomide profiil ja rRNA profiil CAM töötamise puhul (paneel D) on väga sarnased *ΔybeY* tüve kontrollkultuuri profiilidele. CAM juuresolul ei teki ribosoomide lisapartikleid, samas aga kuuluvad 30S alamühikute fraktsiooni (3) ribosoomiosakesed, mis sisaldavad nii 17S, 16S kui ka 16S* rRNA molekule. rRNA lagunemisproduktid sellel pildil tuvastatavad ei ole, kuid neid on märgatud eelnevates eksperimentides, kus rakke lüüsi ülerõhul masinaga MicroFluidizer EmulsiFlex C3 (Avestin) (näide lisa 4).



Joonis 12. *ΔybeY* + pET-YbeY, *ΔybeY* + pET-YbeY_R59A ja *ΔybeY* + pET-YbeY_H114A tüvede ribosoomide ja rRNA profiilid kontrollkultuurides ja CAM töötusel (7 μg/ml) 30°C juures LB söötmes. Rakkude kasvatamisel kasutati 100 μM IPTG induktsiooni. 30-50 A₂₆₀ ühikut ribosome eraldati 10%→25% sahharoosigradiendil, RNA visualiseeriti *Northern blot* meetodil. Selleks kasutatud oligonukleotiidid on joonisel tähistatud järgnevalt: 23S-h25-Fluo - 23S-Fluo; 16S-1220-Fluo - 16S-Fluo; 23S-190-Cy5 - 23S-Cy5; EUB338-Cy5 - 16S-Cy5. Igal paneelil vastavad ribosoomi profiilide piikide numbrid rRNA profiilide fraktsioonide numbritele. Ribosoomide profiilide x-teljele on märgitud gradientide mahavõtmise aeg sekundites ning y-teljele ribosoomiosakeste neelduvus lainepikkusel 260 nm.

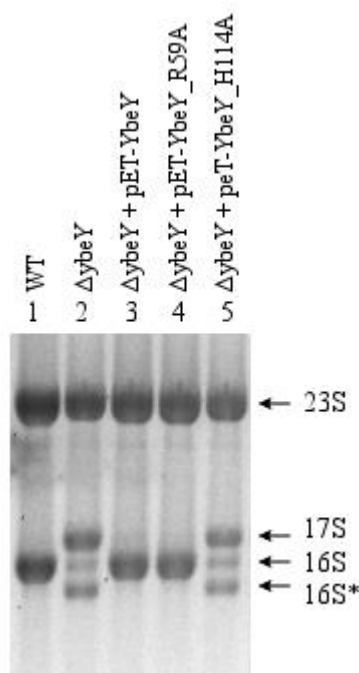
Joonisel 12 on ära toodud $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$, $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_R59A$ ja $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_H114A$ tüvede ribosoomide ja rRNA profiilid. $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$ ribosoomide profiilid nii kontrollkultuuris kui ka CAM töötlusel (joonis 12, paneelid A ja B) on väga sarnased WT profiilidele (joonis 11, paneelid A ja B), mis tähendab, et YbeY ekspressioon $pET\text{-}YbeY$ plasmiidilt on piisav $\Delta ybeY$ komplementatsiooniks ka ribosoomide kokkupanekul. Joonisel 12 tähistavad A ja B paneelil 1. piik 70S ribosoomi, 2. piik 50S alamühikuid ning 4. piik pinnafraktsiooni. Kontrollkultuuri 3. piik tähistab 30S alamühikute fraktsiooni. CAM juuresolul tekivad ka selles tüves lisapartiklid, mida ei ole küll õnnestunud korralikult lahutada ning mis koguti seetõttu sama fraktsioonina (joonis 12, paneel B, piik 3). Lisapartiklid sisaldavad ka $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$ tüves 23S, 16S ja 17S rRNA-d ning nende laguprodukte. Erinevus võrreldes WT tüvega (joonis 11, paneelid A ja B) seisneb selles, et arvestades RNA hulka geelil, näib laguproduktide hulk kontrollkultuuris ja CAM töötamise korral väga sarnased olevat nii 23S kui 16S rRNA puhul.

$\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_R59A$ tüve ribosoomide profiilid (joonis 12, paneelid C ja D) on väga sarnased WT (joonis 11, paneelid A ja B) ja $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$ (joonis 12, paneelid A ja B) tüvede ribosoomide profiilidele nii ilma antibiootikumita kontrollkultuuri kui ka CAM töötamise puhul. Kontrollkultuuris (joonis 12, paneel C) leidub vabu alamühikuid (2 ja 3) vähem kui 70S ribosoomi (1). CAM juuresolul söötmes on peale 70S ribosoomide (1) ja vabade 50S alamühikute (2) tuvastatavad ka ribosoomide lisapartiklid (3 ja 4), kusjuures ka neis leidub nii 23S, 16S 17S rRNA-d kui ka nende laguprodukte. Üldiselt näib CAM töötamise korral laguprodukte veidi rohkem kuhjuvat kui kontrollkultuuris. Erilist tähelepanu võib pöörata väiksemate (umbes 500 aluspaariste) laguproduktide (nii 23S kui 16S) kuhjumisele pinnafraktsioonis (4). Kui 2., 3. ja 4. fraktsioonis 23S rRNA puhul ja 4. fraktsioonis 16S rRNA puhul on näha suuremaid laguprodukte, siis pinnafraktsiooni on jõudnud juba neist lühemaks lagundatud tükid. Sellist efekti on võimalik märgata ka kontrollkultuuri ning mõnede teiste WT ja $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$ tüvede rRNA profiilide puhul.

Kui YbeY-R59A mutanti sisaldav tüvi sarnaneb väga WT ja $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$ tüvedele, siis $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_H114A$ tüve ribosoomide ja rRNA profiilid (joonis 12, paneelid E ja F) sarnanevad hoopis $\Delta ybeY$ tüve omadele (joonis 11, paneelid C ja D). Nagu näha, leidub ka $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_H114A$ tüves nii kontrollkultuuris kui ka CAM (joonis 12, paneelid E ja F) sisaldavas kultuuris 70S ribosoomi (1) vähem kui vabu alamühikuid (2 ja 3). CAM töötlusel ribosoomide lisapartikleid ei teki ning rRNA laguproduktide hulk võrreldes kontrollkultuuriga ei suurene. 30S alamühikud sisaldavad nii 17S, 16S kui ka 16S* rRNA molekule.

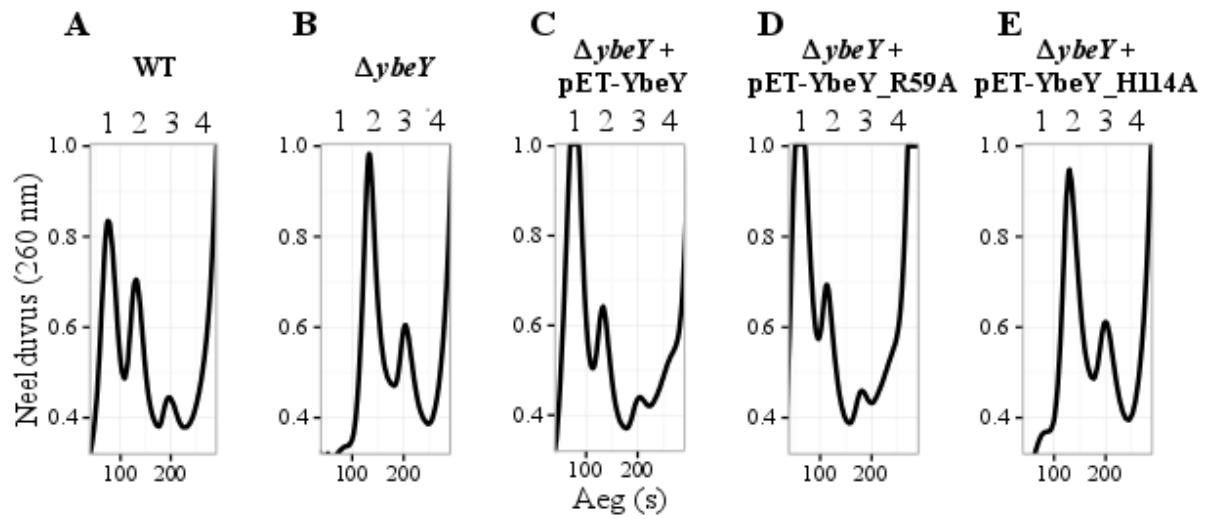
2.3.5. YbeY mutantide rRNA protsessimine ja ribosoomiprofiilid erinevad kuumastressis

Kuna on teada, et YbeY on kuumašoki valk ning selle puudumine mõjub eriti rängalt just kuumastressis rakkudele (Nonaka *et al.*, 2006; Rasouly *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013), soovisin teada saada, kas YbeY inaktiivsed mutandid suudavad kuumastressis metsiktüüpi YbeY puudumist komplementeerida. Eelkatse näitas, et 100 μ M IPTG induksioonil vastas $\Delta ybeY$ + pET-YbeY tüve kasv 37°C juures WT tüve kasvule (andmed pole esitatud). Kuumastressi eksperimendid planeerisin Daviese ja kolleegide töö järgi, kes on näidanud, et pärast üht tundi 45°C juures kasvamist kaob $\Delta ybeY$ rakkudest 16S rRNA, kuid säilivad 17S ja 16S* rRNA molekulid (Davies *et al.*, 2010). Seda tulemust õnnestus ka mul korrata (vt joonis 13, 2. rada). Kuumastressis ei kuhjunud 17S eellasmolekuli ja 16S* rRNA-d WT tüves (rada 1) ega $\Delta ybeY$ + pET-YbeY tüves (rada 3), vaid säilis 16S rRNA. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_R59A tüves (rada 4) on pärast üht tundi temperatuuril 45°C samuti näha küpset 16S rRNA-d. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A tüve rRNA profiil sarnaneb aga taas kord $\Delta ybeY$ tüve omale: võrreldes WT tüvega on suuresti vähenenud 16S rRNA hulk ning kuhjunud on selle eellasmolekul 17S ja 16S* rRNA, millel on puudu 16S rRNA küps ots.



Joonis 13. Uuritavate tüvede rRNA profiilid kuumastressis. Üleöökultuuridest tehti 250x lahjendused 60 ml LB söötmesse, kultuurid kasvatati 37°C juures 220 rpm raputades kuni $OD_{600}=0,3$, misjärel viidi 1 tunniks temperatuurile 45°C (raputamise kiirus samuti 220 rpm). RNA eraldati 2 ml kultuurist kuuma fenooliga ning 5 μ g RNAd visualiseeriti 1,5% denatureerival agarosgeelil.

Kuumastressis (45°C) on WT tüve ribosoomide profiil (joonis 14, paneel A) sarnane 30°C (joonis 11, paneel A) ja 25°C (joonis 9, paneel E) juures kasvanud rakkudest saadud ribosoomide profiilidega: 70S ribosoom (1) on rohkem kui vabu 50S ja 30S alamühikuid (2 ja 3), kuigi 70S ja 50S piikide erinevus ei ole nii suur kui madalamatel temperatuuridel. Nagu oodatud, on ka metsiktüüpi YbeY valguga komplementeeritud $\Delta ybeY$ tüve ribosoomide profiil kuumastressis (joonis 14, paneel C) WT tüvega samasugune. $\Delta ybeY$ tüves (joonis 14, paneel B) on seevastu peaaegu kadunud 70S ribosoomid (piik 1) ning vabu 50S alamühikuid (2) on palju rohkem kui vabu 30S alamühikuid (3). Samamoodi on kuumastressis kadunud $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_H114A$ tüve (joonis 14, paneel E) 70S ribosoomid (1) ning seetõttu suurenenud vabade alamühikute hulk (2 ja 3). $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_R59A$ tüves (joonis 14, paneel D) on aga 70S ribosoomid säilinud (1) ning vabu alamühikuid on vähem (2 ja 3), nagu ka WT ja $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$ tüvedes. Tähelepanelik lugeja võib märgata joonise 14 paneelide C ja D pinnafraktsioonides (4) iseäralikku piigi alget. Arvatavasti on tegu DNAas I poolt lagundamata jäänud lühikeste DNA tükkidega, sest totaalse RNA profiilid ei erine $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY$ ja $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_R59A$ tüvede puhul WT tüve omast (joonis 13, rajad 1, 3 ja 4). Oma rolli võib nende piigilaadsete osakeste tuvastamises mängida ka kuumastressis rakkude väiksem lüüsiefektiivsus ja seetõttu lahjem lüsaat. Samas ei saa välistada, et need fraktsioonid sisaldaksid nendele tüvedele kuumastressis iseloomulikke väiksemaid rRNA laguprodukte, sest nende kahe tüve puhul leidsid piigialged kõikide korduste pinnafraktsioonis ning kasutatud rRNA visualiseerimismeetod Sybr Gold värviga (joonis 13) ei võimalda väiksemaid ja harvem leiduvaid RNA molekule piisavalt visualiseerida. $\Delta ybeY$ ja $\Delta ybeY + pET\text{-}YbeY_H114A$ tüvedes ei esinenud neid piigialgeid pinnafraktsioonis kunagi ning WT tüves leidis see ühes korduses kahest.



Joonis 14. Uuritavate tüvede ribosoomide profiilid kuumastressis (1 h temperatuuril 45°C). 10%→25% sahharoosigradiendile kanti 25-30 A_{260} ühikut ribosoomi. x-teljel on gradientide mahavõtmise aeg sekundites ning y-teljel ribosoomiosakeste neelduvus lainepikkusel 260 nm.

2.4. Arutelu

Minu magistritöö hüpotees oli, et YbeY endoribonukleaasest aktiivsust ei ole tingimata vaja selle valgu kõikide funktsioonide täitmiseks. Kasutasin YbeY katalüütiliselt inaktiivseid mutante YbeY-R59A ja YbeY-H114A selleks, et teada saada, millistes ribosoomide biogeneesi ja lagundamisega seotud protsessides suudab YbeY oma funktsiooni täita ilma endonukleolüütilisi löikeid tegemata ja millistes mitte. Üllatavalt selgus, et nende mutantsete valkude mõju *ΔybeY* tüve fenotübile on erinev.

Varem oli näidatud, et YbeY-R59A ja YbeY-H114A ei suuda täielikult komplementeerida *ΔybeY* tüve kasvu kuumastressis temperatuuril 45°C (Davies *et al.*, 2010). Peale selle oli teada, et YbeY-R59A sisaldavas tüves toimub rRNA protsessimine WT tüve sarnaselt, kuid YbeY-H114A sisaldavas tüves *ΔybeY* tüve sarnaselt (Davies *et al.*, 2010). Seetõttu on Davies ja kolleegid välja pakkunud, et need mutatsioonid mõjutavad YbeY erinevaid funktsioone või rRNA protsessimise funktsiooni erineval määral (Davies *et al.*, 2010). Minu magistritööst selgus, et 30°C juures suudab YbeY-R59A komplementeerida *ΔybeY* tüve kasvudefekti sama hästi kui metsiktüüpi YbeY valk, ent YbeY-H114A seda ei suuda. *ΔybeY* + pET-YbeY_H114A tüve kasvuparameetrid sarnanevad *ΔybeY* tüve omadele. Seega toetab minu töös leitud kasvufenotüüpide erinevus Daviese ja kolleegide oletust funktsioonide erinevuse kohta (Davies *et al.*, 2010). Ent on keeruline öelda, kas need mutantide erinevused kasvukiiruses võivad tuleneda vaid rRNA protsessimise erinevusest. YbeY võib osaleda ka teistes protsessides, mis rakkude kasvufenotüüpi mõjutada võivad (nagu näiteks ribosoomide kvaliteedikontroll (Jacob *et al.*, 2013) ja lagundamine (Anton Paier, avaldamata andmed, TÜTI, Eesti)).

Klooramfenikool takistab translatsiooni, inhibeerides ribosoomi peptidüültransferaasest aktiivsust, ent tekitab ka vigu ribosoomide kokkupanekul. *E. coli* rakkudes tekivad klooramfenikooli (7 µg/ml) juuresolul ribosoomide lisapartiklid (Siibak *et al.*, 2009), kus kuhjuvad 50S ja 30S alamühikute eellapartiklid, mille r-valguline koostis on heterogeenne (Siibak *et al.*, 2011). Need lisapartiklid ei vasta teadaolevatele ribosoomide kokkupaneku intermediaatidele, kuid ometi suudetakse vähemalt osa neist aja möödudes küpseteks 70S ribosoomideks kokku panna (Siibak *et al.*, 2011). On näidatud, et CAM töötlus viib r-valkude tasakaalustamata sünteesini ning muutuste tõttu r-valkude stõhhiomeetrias tekivadki ribosoomide vigased lisapartiklid (Siibak *et al.*, 2011). Oma bakalaureusetöös avastasin, et *ΔybeY* tüves ei teki CAM juuresolul ribosoomide lisapartikleid nagu WT tüves, ning arvasin, et YbeY võib olla vajalik lisapartiklite tekkeks (Hausenberg, 2014). Oma magistritöös kontrollisin oletust, et lisapartiklite puudumine võib olla tingitud hoopis *ΔybeY* tüve

aeglasemast kasvukiirusest, mitte YbeY valgu puudumisest. Selle hüpoteesi kontrollimiseks kasvasin WT ja $\Delta ybeY$ tüvesid erinevatel temperatuuridel, et nende kasvukiiruseid ühtlustada. Näib, et kasvukiirus ei mõjuta ribosoomide kokkupanekut ja ribosoomide lisapartiklite teket CAM töötamise korral, sest WT tüves tekkisid lisapartiklid CAM töötamise puhul ka aeglustatud kasvul ning $\Delta ybeY$ tüves ei tekkinud neid CAM juuresolul ka kiirema kasvu korral.

Oma bakalaureusetöös nägin 23S ja 16S rRNA laguproduktide kuhjumist klooramfenikooli poolt tekitatud lisapartiklites (Hausenberg, 2014). Arvatavasti ei suudeta kõiki vigaseid lisapartikleid parandada ja nende biogeneesi küpsete 70S ribosoomideni välja viia ning vigaseid ribosoomiosakesi lagundavad RNAasid ei suuda samuti toime tulla suurema töökoormusega. Samasugust efekti nägin ka oma magistris töös WT tüves, kus 23S rRNA puhul on CAM töötamisel märgatav mõõdukas laguproduktide hulga suurenemine, võrreldes kontrollkultuuriga. $\Delta ybeY$ tüve 50S ja 30S alamühikute piikide analüüsil *Northern blot*-il olen saanud aga vastuolulisi andmeid. Eelnevates katsetes, kus lüüsisin rakke ülerõhu abil masinas MicroFluidizer EmulsiFlex C3 (Avestin), märkasid 16S ja/või 23S rRNA laguproduktide mõõdukat kuhjumist CAM töötamisel, kuigi ribosoomide lisapartikleid ei tekkinud (vt joonis 15, lisa 4). See viitab võimalusele, et YbeY puudumisel lagundatakse rRNA-d, mis ei saa seetõttu osaleda ribosoomide kokkupanekul ja seondada vales koguses r-alkude ning tekitada ribosoomide lisapartikleid. Samas pole selles töös esitatud mehaanilisel lüüsimetodil (FastPrep-24 masin, MP BioMedicals) lüüsitud $\Delta ybeY$ tüves selliseid laguprodukte tuvastatud. Üks võimalik seletus on, et selle lüüsimetodi tõttu lagundatakse valesti protsessitud rRNA nõnda kiiresti, et seda ei suudeta tuvastada. See erinevus võib tuleneda ka eri lüüsimetodide puhul kasutatud erinevatest kultuurimahtudest ja aeratsioonist. Alternatiivina võib kaaluda võimalust, et YbeY puudumisel ei teki CAM mõjul r-alkude sünteesi stöhhiomeetrias kõrvalkallet ning seetõttu ei teki ribosoomide lisapartikleid. Sel juhul oleks varasemalt tuvastatud rRNA laguproduktide olemasolu olnud juhuslik ning YbeY osaleks CAM poolt tekitatud r-alkude sünteesi regulatsiooni muutumises.

CAM stressis käituvad YbeY inaktiivsed mutandid erinevalt. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_R59A tüves tekivad ribosoomide lisapartiklid, mis sisaldavad 23S, 17S ja 16S rRNA-d ning nende laguprodukte. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A tüves lisapartikleid ei teki ning 30S alamühikud sisaldavad $\Delta ybeY$ tüvele iseloomulikke 17S, 16S ja 16S* rRNA molekule, nii et selle tüve ribosoomide ja rRNA profiilid on praktiliselt identsed $\Delta ybeY$ tüve omadega. Nende tõendite põhjal näib, et YbeY aminohappejäägist R59 sõltuv ribonukleasne aktiivsus ei ole ribosoomide lisapartiklite tekkel oluline, ükskõik mis mehhanismiga YbeY seda protsessi ka

ei mõjutaks. Vastupidiselt näib aga H114 selle jaoks väga vajalik olevat, sest H114 puudumisel lisapartikleid ei teki.

Kuumašoki valkudest rääkides peetakse tavaliselt silmas *chaperon*-valke ja proteaase, mis aitavad hoida valkude natiivset struktuuri või lagundada valesti voltunud valke. Ent tegelikult kuulub kuumašoki valkude hulka ka mitmete teiste protsessidega seotud valke, näiteks 23S rRNA modifitseerimiseks vajalik FtsJ (Bügl *et al.*, 2000) ja 50S alamühikute taaskasutust soodustav Hsp15 (Korber *et al.*, 2000). Seega ei ole üllatav, et ka YbeY, mida on põhiliselt seostatud rRNA, mitte valkude metabolismiga, on kuumašoki valk (Nonaka *et al.*, 2006). Oma magistritöös leidsin, et $\Delta ybeY$ tüves kaovad ühe tunni jooksul 45°C juures praktiliselt kõik 70S ribosoomid. On nähtud, et sellistes tingimustes sureb 99% $\Delta ybeY$ tüve rakkudest (Jacob *et al.*, 2013). Kui rifampitsiini abil inhibeerida transkriptsioon enne temperatuuri tõstmist, kaob $\Delta ybeY$ tüves praktiliselt varasemalt rakkudes korrektselt küpsenud 16S rRNA ning kuhjub selle eellane 17S rRNA ja 16S* rRNA, millel puudub 16S rRNA küps 3' ots (Jacob *et al.*, 2013). Ei 17S ega 16S* sisaldavad 30S alamühikud ei suuda translatsiooni läbi viia (Wireman ja Sypherd, 1974; Shine ja Dalgarno, 1975) ning seetõttu 70S ribosoomide hulk arvatavasti nii rabavalt langebki. Jacob ja kolleegid on välja pakkunud, et kuumastressis on eriti oluline YbeY roll 17S rRNA protsessimisel 16S rRNAks ning YbeY puudumisel tekib 17S rRNAst 16S* rRNA molekul (Jacob *et al.*, 2013). Samuti ei saa siis YbeY osaleda ribosoomide kvaliteedikontrollis ning koostöös RNAas R-ga 16S* ja 17S rRNA-d sisaldavaid ribosoomide lagundada. See teooria aga ei seleta seda, miks kaob rakkudest korrektselt küpsenud 16S rRNA. Kui YbeY protsessiks kuumastressi ajal 17S 16S rRNAks, oleks loogiline tuvastada 17S rRNA kuhjumist, ent juba varem protsessitud 16S rRNA ei tohiks kaduda. Seetõttu näib, nagu oleks kuumastressi ajal YbeY valgul 16S 3' otsa suhtes hoopis kaitsev funktsioon, mis ei lase seda 16S* rRNAks lagundada. Alternatiivina võib kaaluda võimalust, et 16S* rRNA teke kuulub tavapärase 16S rRNA küpsemise protsessi juurde ning YbeY suunab tekkiva 16S* rRNA kiiresti lagundamisele ja seetõttu ei leidu 16S* rRNA-d metsiktüüpi rakkudes. Kuid see julge oletus näib ebatõenäoline, sest viitab väga ebaefektiivse rRNA protsessimise etapi püsima jäämisele evolutsioonis ning ka see teooria ei vasta küsimusele, miks kaob kuumastressi ajal juba varem küpsenud korrektselt protsessitud 16S rRNA.

Selle probleemistiku muudab veel keerulisemaks fakt, et ka kuumastressis on YbeY inaktiivsete mutantide fenotüübid erinevad. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A tüves kaovad 70S ribosoomid ja 16S rRNA ning kuhjuvad 17S ja 16S* rRNA nagu $\Delta ybeY$ tüveski. See-eest ei näi kuumastress $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_R59A tüve ribosoomide ja rRNA-d oluliselt mõjutavat,

nagu ka WT tüves. See näib olevat vastuoluline Daviese ja kolleegide tulemustega, kus nad märkasid YbeY-R59A sisaldavas tüves kasvu tundlikkust 45°C juures, mis omakorda võiks viidata translatsioonidefektidele (Davies *et al.*, 2010).

Neid tõendeid arvesse võttes on selge, et R59 ja H114 roll YbeY ensümaatilise aktiivsuse määramisel on erinev, kuigi mõlema muteerimisel kaob YbeY endoribonukleasne aktiivsus (Jacob *et al.*, 2013). Minu töö tulemusi võib tõlgendada nõnda, et R59 on vajalik RNA lõikamiseks ning H114 on vajalik RNA või valkude seondamiseks või nendega interakteerumiseks. Sellise mudeli järgi võiks R59 osaleda substraadi seondumisel (Davies *et al.*, 2010) või otseselt katalüüsil. Sellisel juhul näitaksid selle töö tulemused, et YbeY ei ole CAM poolt põhjustatud stressis ega kuumastressis vajalik endoribonukleasina, vaid piisab selle interaktsioonidest rRNA või valkudega, et tagada WT tüve fenotüüp. Kuidas aga tõlgendada sel juhul YbeY-H114A põhjustatud fenotüüpe? Kuna H114 on osana histidiini triaadist vajalik metalliiooni sidumiseks, ei seo YbeY-H114A korrektselt metalliiooni. Seetõttu võib YbeY valgu struktuur piisavalt muutuda, et mitte interakteeruda tavapäraselt RNA ja/või valkudega. Seepärast võib H114A mutatsioon anda fenotüübi, mis on iseloomulik $\Delta ybeY$ tüvele.

E. coli YbeY valk kuulub UPF0054 valguperekonda (Pfam andmebaasis). Selle valguperekonna histidiini triaadi (H3XH5XH) konsensusjärjestuseks on Prosite andmebaasis määratud H-[GSA]-x-[LVCYT]-H-[LAI]-[LIMSANQVF]-G-[FYWMH]-x-[HD]. See motiiv sarnaneb maatriksi metalloproteasid histidiini triaadi motiivile HEXXHXXGXXH, sest kolme His jääki eraldab sama arv aminohappejääke ning konserveerunud on motiivi kaheksandas positsioonis asuv glütsiin. Maatriksi metalloproteasid on ensüümid, mis lagundavad valke ja peptiide ning on eriti olulised ekstratsellulaarse maatriksi lagundamisel. Maatriksi metalloproteasid seonduvad oma histidiini triaadi abil Zn^{2+} iooniga. Maatriksi metalloproteasid peptiidsideme lagundamise katalüüsis on oluline osa Zn^{2+} ioonil ja motiivi teises positsioonis asuval glutamaadijäägil. Histidiinijäägid on vaid Zn^{2+} ligandiks ning konserveerunud glütsiin on vajalik peptidahela järsuks pöördeks, et kolmas His jääk saaks samuti Zn^{2+} iooniga interakteeruda (vt ülevaade Tallant *et al.*, 2010). Seega ei ole YbeY histidiini triaadiga väga sarnase motiivi puhul leitud, et His jäägid osaleksid otseselt katalüüsis, küll aga metalliiooni osalust katalüüsis, mida on ka YbeY puhul kaudselt näidatud (Jacob *et al.*, 2013). YbeY histidiini triaadi motiivis ei leidu katalüütilist glutamaadijääki, mistõttu polegi arvatavasti tegemist peptidaasi või proteaasiga, vaid RNAasiga. Ei ole välistatud võimalus, et mõni muu aminohappejääk osaleks otseselt RNA lõikamise katalüüsis, kuid Davies ja kolleegid ei leidnud seitsme UPF0054 perekonna valgu järjestuse joondamisel

histidiini triaadi motiivi lähedusest ühtegi teist konserveerunud aminohapet (Davies *et al.*, 2010). Ülejäänud 13 konserveerunud aminohapet, millest muteeriti Daviese ja kaasautorite töös vaid viis (Davies *et al.*, 2010), asuvad kõik YbeY tertsiaarstruktuuris histidiini triaadi motiivi vastas, üle arvatava substraadi sidumise vao. Seega on alust arvata, et YbeY endoribonukleaasse aktiivsuse toimimiseks ei piisa vaid histidiini triaadist ja metalliioonist.

On olemas näide, kus ühe aminohappe muutmisel muutub valgus struktuur. Kui histidiini triaadi sisaldavas valgus proteaas C, mis kuulub serralüsiinide perekonda, muteerida histidiini triaadist allavoolu asuv konserveerunud metioniin teisteks aminohappejääkideks, muutub antud histidiini triaadi Zn^{2+} iooni sidumise geomeetria. Seejuures tõuseb ka suurte peptiidahelate segmentide liikuvus (Oberholzer *et al.*, 2009). Seega ei ole võimatu, et ühe aminohappe olemasolust sõltub terve ensüümi (aktiivtsentri) struktuur (Oberholzer *et al.*, 2009). Teoreetiliselt on see võimalik ka YbeY puhul.

Üheks minu töö põhioletuseks oli, et YbeY võib seonduda 16S rRNAga, takistades nõnda eksoribonukleaaside edasi liikumist ning RNA lagundamist. Sarnane hüpotees on püstitatud ka Era valgus puhul (Tu *et al.*, 2009), mille geen asub mõnes bakteris *ybeY* geeniga samas operonis või on sellega isegi kokku fuseerunud (Jacob *et al.*, 2013). Era on *E. coli*'le eluliselt tähtis GTPaas, mida arvatakse osalevat lisaks teistele füsioloogilistele protsessidele ka 16S rRNA 3' otsa küpsemises (vt ülevaade Verstraeten *et al.*, 2011). On näidatud, et Era seondub GTP-ga seondunult 17S rRNA molekulile 16S rRNA küpsele 3' otsa lõpule väga lähedale ning vabastab küpse 16S rRNA 3' otsa, kui on toimunud GTP hüdroolüüs (Tu *et al.*, 2009). Ent isegi kui Era on vajalik eksoribonukleaaside peatamiseks, ei seleta see $\Delta ybeY$ tüve fenotüüpi.

On selge, et YbeY valgus on oluline osa 16S rRNA 3' otsa metabolismis ning seda eriti kuumastressis. R59, H114 ja teiste konserveerunud aminohapete tõelise rolli välja selgitamiseks YbeY funktsioneerimisel oleks vajalik määrata kristallstruktuuride abil kindlaks täpne YbeY katalüüsimehhanism RNA lõikamisel.

KOKKUVÕTE

Escherichia coli 16S rRNA 3' otsa protsessimise täpset mehhanismi pole välja selgitatud, kuigi arvatakse, et selles osalevad neli eksoribonukleaasi (Sulthana ja Deutscher, 2013). Selgusetuks on jäänud, kuidas need suudavad RNA lagundamise 3' küpse otsa juures lõpetada. Endoribonukleaasi YbeY puudumisel on nähtud defekte 16S rRNA 3' otsa protsessimisel, mistõttu on seda ensüümi samuti selle protsessimismehhanismiga seostatud (Davies *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013). Peale selle on näidatud YbeY osalust ribosoomide kvaliteedikontrollis (Jacob *et al.*, 2013) ja küpsete ribosoomide lagundamisel (Anton Paier, avaldmata andmed, TÜTI, Eesti). Minu magistritöö eesmärk oli uurida, kas YbeY endoribonukleasne aktiivsus on vajalik selle valgu funktsioonide täitmiseks. Selleks kasutasin $\Delta ybeY$ tüve komplementatsioonil katalüütiliselt inaktiivseid mutante YbeY-R59A ja YbeY-H114A. Kui mutandid annaksid metsiktüüpi YbeY fenotüübi, oleks selge, et ensümaatilist aktiivsust uuritavates protsessides vaja ei lähe. Kui mutandid annaksid YbeY valgu puudumise fenotüübi, saaks väita, et antud protsessides on YbeY endoribonukleasne aktiivsus oluline selle funktsioonide täitmiseks. Neid mutante uuriti mitmetel tingimustel, sest eri protsessides võib vaja minna YbeY erinevaid funktsioone. Vastu ootusi käitusid need mutandid erinevalt.

YbeY-R59A komplementatsioonil meenutasid $\Delta ybeY$ tüve kasvukõverad metsiktüüpi tüve omasid, klooramfenikooli tekitatud stressis tekkisid ribosoomide lisapartiklid nagu WT tüves ning kuumastressis suutis see tüvi metsiktüüpi tüve sarnaselt korrektseid ribosoomide säilitada. $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A tüve fenotüübid sarnanesid aga kõigis uuritud protsessides $\Delta ybeY$ tüve fenotüüpidele. Kasv aeglustus, 30S ribosoomid sisaldasid 17S, 16S ja 16S* rRNA molekule, klooramfenikooli töötlusel ei tekkinud ribosoomide lisapartikleid. Kuumastressis kadusid 70S ribosoomid ja 16S rRNA ning kuhjusid 17S ja 16S* rRNA.

Nende tõendite põhjal olen loonud esialgse mudeli, kus aminohappejääk R59 on vajalik katalüüsiks ning aminohappejäägist H114, mis kuulub metalliiooni seondavasse histidiini triaadi, sõltub YbeY aktiivtsentri struktuur ja RNA või valkude seondamise võime. H114A mutatsiooni korral peaks sel juhul YbeY struktuur muutuma piisavalt, et olla võimetu RNA või valkudega interakteeruma. R59A mutatsiooni fenotüübid näitaksid sel juhul, et uuritud protsessides ei lähe vaja YbeY endoribonukleasset aktiivsust, vaid selle korrektset struktuuri. Esitatud mudeli tõestamiseks või ümberlükkamiseks oleks vaja YbeY kristallstruktuuride abil teada saada nende aminohappejääkide tõeline roll RNAGA seondumisel ja selle lõikamisel. YbeY täpne töömehhanism rRNA protsessimisel, ribosoomide kokkupanekul, nende kvaliteedikontrollis ja lagundamisel vajab veel edasist uurimist.

On the Mechanism of Action of YbeY in rRNA and Ribosome Metabolism in *Escherichia coli*

Sille Hausenberg

SUMMARY

Ribosomes are macromolecular complexes that conduct protein synthesis in the cells. In *Escherichia coli*, ribosomes consist of 23S, 16S and 5S rRNA molecules and 51 ribosomal proteins. Therefore, their structure and biogenesis is quite complicated. Ribosome biogenesis includes the synthesis of rRNA, its processing and modifications as well as the synthesis of ribosomal proteins and their modifications. The processing of rRNA, binding of rRNA and ribosomal proteins and subsequent changes in rRNA structure take place at the same time. Thus, defects in ribosome assembly are not rare and mechanisms for the degradation of faulty ribosomal particles have been developed in the cells to guarantee effective translation.

There is a lot unknown concerning the biogenesis of ribosomes, but one of the most interesting inconsistencies involves the processing of 16S 3' terminus. Sulthana and Deutscher have shown that the existence of four exoribonucleases (RNase II, RNase R, PNPase and RNase PH) is sufficient for the removal of additional nucleotides left there from the RNase III excision (Sulthana and Deutscher, 2013). However, it is not explained how these exoribonucleases are refrained from degrading 16S rRNA further than the mature 3' terminus. Furthermore, in the absence of endoribonuclease YbeY there are also notable defects in 16S rRNA 3' terminus maturation: besides 16S rRNA accumulate in the cells its precursor 17S rRNA and a shorter 16S rRNA species, 16S* rRNA which lacks the mature 3' terminus of 16S rRNA (Davies *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013). Therefore it has been suggested that YbeY participates in the processing of 16S rRNA 3' terminus, whether by an endonucleolytic cut (Jacob *et al.*, 2013) or by modulating the activities of exoribonucleases (Davies *et al.*, 2010). YbeY is also involved in ribosome quality control (Jacob *et al.*, 2013) and degradation of mature ribosomes (Anton Paier, unpublished work, TUIT, Estonia). This work has attempted to shed light on the necessity for YbeY's endoribonuclease activity in its different functions.

To achieve this, complementation plasmids pET-YbeY, pET-YbeY_H114A and pET-YbeY_R59A for $\Delta ybeY$ strain have been constructed. YbeY mutant proteins YbeY-R59A and YbeY-H114A have been shown to possess at least 10 000 fold decrease in their enzymatic activity (Jacob *et al.*, 2010). We predicted that if these mutants evoke the phenotype of WT

strain, the endoribonuclease activity is not needed for YbeY to fill its functions. However, if the mutant proteins incur a phenotype characteristic to $\Delta ybeY$ strain, it would be clear that the enzymatic activity is important for YbeY to function. These mutants were expressed in $\Delta ybeY$ strain in multiple conditions as different functions of YbeY might be needed in different processes. Surprisingly, the enzymatically inactive proteins YbeY-R59A and YbeY-H114A gave different phenotypes.

At 30°C, YbeY-R59A evoked a growth phenotype that resembled WT strain's growth, but YbeY-H114 brought about a growth phenotype similar to $\Delta ybeY$ strain. The treatment of chloramphenicol (7 $\mu\text{g/ml}$) induced aberrant ribosomal particles in both WT and $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_R59A strains, but no additional particles appeared in $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A strain as is the case for the $\Delta ybeY$ strain. In heat stress, 70S ribosomes disappeared in the absence of YbeY and in the presence of YbeY-H114A, but not in the presence of YbeY-R59A. There was also a notable decrease in the amount of 16S rRNA and increase in the amount of 17S and 16S* rRNA molecules in $\Delta ybeY$ and $\Delta ybeY$ + pET-YbeY_H114A strains. In the presence of wild-type YbeY or YbeY-R59A, the ribosome and rRNA profiles remained normal during heat stress.

Taking this evidence into consideration, it is possible to create a model for the behaviour of amino acid residues R59 and H114 in the function of YbeY. It is proposed that R59 is necessary for the catalytic activity of YbeY while H114, that belongs to a metal ion binding histidine triad, is responsible for the correct structure of YbeY and its active centre. The mutation H114A should disrupt the structure of YbeY so that it can not bind or interact with RNA or other proteins, for example the exoribonucleases. Therefore, it could not fill its role in 16S rRNA processing. If R59 was indeed involved in the catalysis of RNA cleavage, these results would indicate that the endoribonuclease activity of YbeY is not necessary for its correct functioning in 16S rRNA processing. Thus, its binding to the rRNA could be sufficient to fulfill its function. To test the proposed model, it should be needed to describe the mechanisms of catalysis and RNA binding of YbeY using crystal structures. Thus, the elucidation of the exact role of YbeY in rRNA processing, ribosome assembly, ribosome quality control and degradation requires more research.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knock-out mutants – the Keio collection. *Mol Systems Biol.* 2: 2006.0008.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* 289: 905-920.
- Basturea, G. N., Zundel, M. A., Deutscher, M. P. (2011). Degradation of ribosomal RNA during starvation: Comparison to quality control during steady-state growth and a role for RNase PH. *RNA.* 17: 338-345.
- Beppu, T., Arima, K. (1969). Induction by mercuric ion of extensive degradation of cellular ribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 98: 888-897.
- Bram, R. J., Young, R. A., Steitz, J. A. (1980). The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell.* 19: 393-401.
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M. Jr, Carter, A. P., Wimberly, B. T., Ramakrishnan, V. (2002). Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J Mol Biol.* 316: 725-768.
- Bubunenko, M., Korepanov, A., Court, D. L., Jagannathan, I., Dickinson, D., Chaudhuri, B. R., Garber, M. B., Culver, G. M. (2006). 30S ribosomal subunits can be assembled *in vivo* without primary binding ribosomal protein S15. *RNA.* 12: 1229-1239.
- Bügl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., Bardwell, J. C., Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell.* 6: 349-360.
- Cech, T. R. (2000). The Ribosome is a Ribozyme. *Science.* 289: 878-879.
- Charollais, J., Dreyfus, M., Iost, I. (2004). CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* 32: 2751-2759.
- Charollais, J., Pflieger, D., Vinh, J., Dreyfus, M., Iost, I. (2003). The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 48: 1253-1265.

- Chen, S. S., Williamson, J. R. (2013). Characterization of the Ribosome Biogenesis Landscape in *E. coli* using Quantitative Mass Spectrometry. *J Mol Biol.* 425: 767-779.
- Cheng, Z.-F., Deutscher, M. P. (2003). Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *PNAS.* 100: 6388-6393.
- Chittum, H. S., Champney, W. S. (1995). Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. *Curr Microbiol.* 30: 273-279.
- Colson, C., Lhoest, J., Urlings, C. (1979). Genetics of ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*. III. Map position of two genes, *prmA* and *prmB*, governing methylation of proteins L11 and L3. *Mol Gen Genet.* 169: 24-250.
- Condon, C., Squires, C., Squires, C. L. (1995). Control of rRNA Transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 59: 623-645.
- Datsenko, K. A., Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* 97: 6640-6645.
- Davies, B. W., Köhrer, C., Jacob, A. I., Simmons, L. A., Zhu, J., Aleman, L. M., RajBhandary, U. L., Walker, G. C. (2010). Role of *Escherichia coli* YbeY, a highly conserved protein, in rRNA processing. *Mol Microbiol.* 78: 506-518.
- Davis, B. D., Luger, S. M., Tai, P. C. (1986). Role of Ribosome Degradation in the Death of Starved *Escherichia coli* Cells. *J Bacteriol.* 166: 439-445.
- Deutscher, M. (2003). Degradation of Stable RNA in Bacteria. *J Biol Chem.* 278: 45041-45044.
- Deutscher, M. (2009). Maturation and Degradation of Ribosomal RNA in Bacteria. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 85: 369-390.
- Diges, C. M., Uhlenbeck, O. C. (2001). *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *EMBO J.* 20: 5503-5512.
- Ellis, H. M., Yu, D., DiTizio, T., Court, D. L. (2001). High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *PNAS.* 98: 6742-6746.

- Erental, A., Sharon, I., Engelberg-Kulka, H. (2012). Two Programmed Cell Death Systems in *Escherichia coli*: An Apoptotic-Like Death Is Inhibited by the mazEF Mediated Death Pathway. PLoS Biol. 10: e1001281.
- Erental, A., Kalderon, Z., Saada, A., Smith, Y., Engelberg-Kulka, H. (2014). Apoptosis-Like Death, an Extreme SOS Response in *Escherichia coli*. mBio. 5: e01426-14.
- Foster, C., Champney, W. S. (2008). Characterization of a 30S ribosomal subunit assembly intermediate found in *Escherichia coli* cells growing with neomycin or paromomycin. Arch Microbiol. 189: 441-449.
- Frazier, A. D., Champney, W. S. (2012). Impairment of ribosomal subunit synthesis in aminoglycoside-treated ribonuclease mutants. Arch Microbiol. 194: 1033-1041.
- Gupta, N., Culver, C. M. (2014). Multiple *in vivo* pathways for *E. coli* small ribosomal subunit assembly occur on one pre-rRNA. Nat Struct Mol Biol. 21: 937-943.
- Gutell, R. R. 1996. Comparative sequence analysis and the structure of 16S and 23S rRNA, p. 111–128. In R. A. Zimmermann, and A. E. Dahlberg (ed.), Ribosomal RNA. Structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis. CRC Press, New York, NY.
- Gutgsell, N. S., Jain, C. (2012). Role of precursor sequences in the ordered maturation of *E. coli* 23S ribosomal RNA. RNA. 18: 345-353.
- Hausenberg, S. (2014). Ribonukleaaaside RNAas R ja YbeY rollist ribosoomide lagundamisel *Escherichia coli*'s. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool
- Jackson, R. W., DeMoss, J. A. (1965). Effects of toluene on *Escherichia coli*. J Bacteriol. 90: 1420-1425.
- Jacob, A. I., Köhrer, C., Davies, B.W., RajBhandary, U. L., Walker G. C. (2013). Conserved Bacterial RNase YbeY Plays Key Roles in 70S Ribosome Quality Control and 16S rRNA Maturation. Mol Cell. 49: 427-438.
- Jacobson, A., Gillespie, D. (1968). Metabolic Events Occurring During Recovery from Prolonged Glucose Starvation in *Escherichia coli*. J Bactriol. 95: 1030-1039.
- Jin, D., Cagliero, C. and Zhou, Y. (2012). Growth rate regulation in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 36: 269-287.

- Kaczanowska, M. and Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71: 477-494.
- Kaplan, R., Apirion, D. (1975a). The Fate of Ribosomes in *Escherichia coli* Cells Starved for a Carbon Source. J Biol Chem. 250: 1854-1863.
- Kaplan, R, Apirion, D. (1975b). Decay of Ribosomal Ribonucleic in *Escherichia coli* Cells Starved for Various Nutrients. J Biol Chem. 250: 3174-3178.
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T., Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* mqsR and ygiT genes encode a new toxin-antitoxin pair. J Bacteriol. 192: 2908-2919.
- King, T. C., Sirdeskmukh, R., Schlessinger, D. (1986). Nucleolytic Processing of Ribonucleic Acid Transcripts in Procaryotes. Microbiol Rev. 50: 428-451.
- Kitahara, K., Miyazaki, K. (2011). Specific inhibition of bacterial RNase T2 by helix 41 of 16S ribosomal RNA. Nat Commun. 2: 549.
- Korber, P., Stahl, J. M., Nierhaus, K. H., Bardwell, J. C. (2000). Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. EMBO J. 19: 741-748.
- Krzyzosiak, W., Denman, R., Nurse, K., Hellmann, W., Boublik, M., Gehrke, C. W., Agris, P. F., Ofengand, J. (1987). *In vitro* synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome. Biochemistry. 26: 2353-2364.
- Lambert, P. A., Smith, R. W. (1976). Antimicrobial action of dodecyl-diethanolamine: activation of ribonuclease I in *Escherichia coli*. Microbios. 17: 35-49.
- Lhoest, J., Colson, C. (1981). Cold-sensitive ribosome assembly in an *Escherichia coli* mutant lacking a single methyl group in ribosomal protein L3. Eur J Biochem. 121: 33-37.
- Li, Z., Deutscher, M. P. (1995). The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. Proc Natl Acad Sci USA. 92: 6883-6886.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher M. P. (1999a). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. EMBO J. 18: 2878-2885.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher M. P. (1999b). Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. RNA. 5: 139-146.

- Liiv, A., Tenson, T., Remme, J. (1996). Analysis of the ribosome large subunit assembly and 23S rRNA stability *in vivo*. J Mol Biol. 263: 396–410.
- Lorsch, J. R. (2002). RNA Chaperones Exist and DEAD Box Proteins Get a Life. Cell. 109: 797-800.
- Maiväli, Ü., Paier, A., Tenson, T. (2013). When stable RNA becomes unstable: the degradation of ribosomes in bacteria and beyond. Biol Chem. 394: 845-855.
- Misra, T. K., Apirion, D. (1979). RNase E, an RNA Processing Enzyme from *Escherichia coli*. J Biol Chem. 254: 11154-11159.
- de Narvaez, C. C , Schaup, H. W. (1979). *In vivo* transcriptionally coupled assembly of *Escherichia coli* ribosomal subunits. J Mol Biol. 134: 1-22.
- Neu, H. C., Heppel, L. A. (1964). The release of ribonuclease into the medium when *Escherichia coli* cells are converted to spheroplasts. J Biol Chem. 239: 3893-3900.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., Rhodius, V. A. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ_{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. Genes Dev. 20: 1776-1789.
- Oberholzer, A. E., Bumann, M., Hege, T., Russo, S., Baumann, U. (2009). Metzincin's canonical methionine is responsible for the structural integrity of the zinc-binding site. Biol Chem. 390: 875-881.
- Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, T., Maiväli, Ü. (2011). Ribosome degradation in growing bacteria. EMBO Rep. 12: 458-462.
- Powers, T., Daubresse, G., Noller, H. F. (1993). Dynamics of *in vitro* assembly of 16S rRNA into 30S ribosomal subunits. J Mol Biol. 232: 362-374.
- Quan, J., Tian, J. (2009). Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. PLoS ONE. 4: e6441.
- Quan, J., Tian, J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. Nature Protocols. 6: 242-251.
- Ramagopal, S. (1984). Metabolic changes in ribosomes of *Escherichia coli* during prolonged culture in different media. Eur J Biochem. 140: 353-361.

- Rasouly, A., Schonbrun, M., Shenhar, Y., Ron, E. Z. (2009). YbeY, a Heat Shock Protein Involved in Translation in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 191: 2649-2655.
- Rasouly, A., Davidovich, C., Ron, E. Z. (2010) The Heat Shock Protein YbeY Is Required for Optimal Activity of the 30S Ribosomal Subunit. J Bacteriol. 192: 4592-4596.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd Edition, 1.110. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schäferkordt, J., Wagner, R. (2001). Effects of base change mutations within an *Escherichia coli* ribosomal RNA leader region on rRNA maturation and ribosome formation. Nucleic Acids Res. 29: 3394-3403.
- Serdyuk, I. N., Agalarov, S. C., Sedelnikova, S. E., Spirin, A. S., May, R. P. (1983). Shape and compactness of the isolated ribosomal 16 S RNA and its complexes with ribosomal proteins. J Mol Biol. 169: 409-425.
- Shine, J., Dalgarno, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature. 254: 34-38.
- Siibak, T., Peil, L., Xiong, L., Mankin, A., Remme, J., Tenson, T. (2009). Erythromycin- and Chloramphenicol-Induced Ribosomal Assembly Defects Are Secondary Effects of Protein Synthesis Inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 53: 563-571.
- Siibak, T., Peil, L., Dönhöfer, A., Tats, A., Remm, M., Wilson, D. N., Tenson, T., Remme, J. (2011). Antibiotic-induced ribosomal assembly defects result from changes in the synthesis of ribosomal proteins. Mol Microbiol. 80: 54-67.
- Silvers, J. A., Champney, W. S. (2005). Accumulation and turnover of 23S ribosomal RNA in azithromycin-inhibited ribonuclease mutant strains of *Escherichia coli*. Arch Microbiol. 184: 66-77.
- Sulthana, S., Deutscher, M. P. (2013). Multiple Exoribonucleases Catalyze Maturation of the 3' Terminus of 16S Ribosomal RNA (rRNA). J Biol Chem. 288: 12574-12579.
- Suzuki, H., Kilgore, W. W. (1967). Decomposition of Ribosomal Particles in *Escherichia coli* treated with Mitomycin C. J Bacteriol. 94: 666-676.

- Zhan, C., Fedorov, E. V., Shi, W., Ramagopal, U. A., Thirumuruhan, R., Manjasetty, B. A., Almo, S. C., Fiser, A., Chance, M. R., Fedorov A. A. (2005). The ybeY protein from *Escherichia coli* is a metalloprotein. *Acta Crystallogr F*. 61: 959-963.
- Tallant, C., Marrero, A., Gomis-Rüth, F.-X. (2010). Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta*. 1803: 20-28.
- Trayhurn, P., Duncan, J. S., Nestor, A., Thomas, M. E. A., Rayner, D. V. (1994). Chemiluminescent Detection of mRNAs on Northern Blots with Digoxigenin end-Labeled Oligonucleotides. *Anal Chem*. 222: 224-230.
- Tu, C., Zhou, X., Tropea, J. E., Austin, B. P., Waugh, D. S., Court, D. L., Ji, X. (2009). Structure of ERA in complex with the 3' end of 16S rRNA: Implications for ribosome biogenesis. *PNAS*. 106: 14843–14848.
- Usary, J., Champney, W. S. (2001). Erythromycin inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol*. 40: 951-962.
- Verstraeten, N., Fauvart, M., Versées, W., Michiels, J. (2011). The Universally Conserved Prokaryotic GTPases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 75: 507-542.
- Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V. (2010). The Mechanism for Activation of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *Science*. 330: 835-838.
- Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada A., Nagai, K. (1999). *Escherichia coli* cafA gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 259: 483-488.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. 2004. *Molecular Biology of the Gene*, p. 423-450, 5th ed., CSHL Press, New York, NY.
- Weeks, K. M. (1997). Protein-facilitated RNA folding. *Curr Opin Struct Biol*. 7: 336-342.
- Williamson, J. R. (2003). After the ribosome structures: How are the subunits assembled? *RNA*. 9: 165-167.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M. Jr, Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407: 327-339.

Wireman, J. W., Sypherd, P. S. (1974). Properties of 30S Ribosomal Particles Reconstituted from Precursor 16S Ribonucleic Acid. *Biochemistry*. 13: 1215-1221.

Woodson, S. A. (2000). Recent insights on RNA folding mechanisms from catalytic RNA. *Cell Mol Life Sci*. 57: 796-808.

Young, R. A., Steitz, J. A. (1978). Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75: 3593-3597.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID JA TARKVARA

PDB andmebaas, YbeY kristallstruktuur:

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1XM5> (26.05.2016)

Pfam andmebaas, UPF0054 valguperekond:

<http://pfam.xfam.org/family/PF02130> (25.05.2016)

Prosite andmebaas, UPF0054 valguperekonna histidiini triaadi motiivi konsensusjärjestus:

<http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/prosite-search-ac?PDOC01010> (25.05.16)

SnapGene® tarkvara (GSL Biotech; saadaval snapgene.com)

R statistikatarkvara. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

DataAcquisition programm (Indrek Must, Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi aparatuuriehituse tuumiklabor)

LISA 1

Tabel 1. Käesolevas töös CPEC meetodi ja sekveneerimise jaoks kasutatud praimerid.

Nr	Praimeri nimi	Seondumiskoht	Järjestus (5'→3')
1	CPEC_pET_REV	pET-Orange plasmiid	GTCGACAAGCTTGCGGCC
2	CPEC_pET_FOR	pET-Orange plasmiid	AGATCTCCTCCTATTGGATC TGATAAATTGTTAAAGAG
3	CPEC_pET/ YbeY_FOR	pET-Orange plasmiid ja <i>ybeY</i> geeni lõpp	GGCCGCAAGCTTGTCGACttat tctttctcggcaatgtacggatcc
4	CPEC_pET/YbeY_ REV	pET-Orange plasmiid ja <i>ybeY</i> geeni algus	CTCTTTAACAATTTATCAGA TCCAATAGGAGGAGATCTatg agtcaggtgatcctcgattacaact
5	CPEC_H114A_REV	<i>ybeY</i> geeni H114A mutatsiooni ümbrus	TGGTGGTGgccggcagctgcatttgtt aggt
6	CPEC_H114A_FOR	<i>ybeY</i> geeni H114A mutatsiooni ümbrus	ACTGCCGgccaccacatatgcgccca g
7	CPEC_R59A_REV	<i>ybeY</i> geeni R59A mutatsiooni ümbrus	AATCTGACCTATgccgtaaggata agccgaccaac
8	CPEC_R59A_FOR	<i>ybeY</i> geeni R59A mutatsiooni ümbrus	ATCCTTACCGgcataggtcagattcag actgtggct
9	Seq_pET1	pET plasmiidid	TTATTGCTCAGCGGTG
10	Seq_lacI1	<i>lacI</i> geeni algus pET plasmiididel	TAATTCAGCTCCGCCATC

LISA 2

Tabel 3. Insertide ja vektorite paljundamise PCR segu koostis komplementatsiooni-plasmiidide konstrueerimisel.

Koostisosa (algne kontsentratsioon)	Ruumala 50 µl reaktsiooni kohta	Lõplik kogus 50 µl reaktsioonis
Phusion HF puhver (5x)	10 µl	1x
dNTP segu (40 mM)	1 µl	0,8 mM
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	1 U
Edasivaatav praimer (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Tagasivaatav praimer (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
WT DNA / pET-Orange (1 ng/ µl)	3 µl / 2 µl	? / 2 ng
MQ vesi	30,5 µl / 31,5 µl	30,5 µl / 31,5 µl

Tabel 4. PCR programm insertide ja vektorite paljundamiseks komplementatsiooni-plasmiidide loomisel.

Tsükli number	Denaturatsioon	Hübridisatsioon	Ekstensioon
1	98°C, 30 s		
2-31	98°C, 10 s	(T _m +3°C), 30 s	72°C, 15s/1000bp
32			72°C, 5 min

Tabel 5. Komplementatsiooni-plasmiidide konstrueerimisel iga inserdi või vektori jaoks kasutatud praimerid (numbrid ja seondumise asukohad joonisel 4 ning numbrid ja järjestused tabelis 1 lisas 1) ja konkreetne hübridisatsiooni temperatuur ning ekstensiooniaeg PCR-l.

Insert või vektor	Järjestuse pikkus	Kasutatud praimerid	(T _m +3)°C	Ekstensiooniaeg
Insert 1	524 bp	3 ja 4	63°C	9 sek
Insert 2	155 bp	3 ja 5	63°C	9 sek
Insert 3	386 bp	4 ja 6	60°C	9 sek
Insert 4	324 bp	3 ja 7	63°C	9 sek
Insert 5	224 bp	4 ja 8	63°C	9 sek
Vektor 1	4847 bp	1 ja 2	60°C	75 sek
Vektor 2	4847 bp	1 ja 2	60°C	75 sek

Tabel 6. CPEC reaktsioonisegu koostis komplementatsiooniplasmiidide konstrueerimisel. Insert:Vektor molaarne suhe peab olema 1:1 või 1:2.

Koostisosa (algne kontsentratsioon)	Ruumala 20 µl reaktsiooni kohta	Lõplik kogus 20 µl reaktsioonis
Phusion HF puhver (5x)	4 µl	1x
dNTP segu (40 mM)	0,4 µl	0,8 mM
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	1 U
Vektor	Oleneb kontsentratsioonist	100-200 ng
Inserdid	Oleneb kontsentratsioonist	Oleneb vektori hulgast
MQ vesi	Kuni 20 µl	

Tabel 7. CPEC reaktsiooni programm komplementatsiooniplasmiidide loomisel.

Tsükli number	Denaturatsioon	Aeglane järguline hübridisatsioon	Hübridisatsioon	Ekstensioon
1	98°C, 30 s			
2-26	98°C, 10 s	70°C→55°C 3 min	55°C, 30 s	72°C, 60s
27				72°C, 5 min

Tabel 8. Komplementatsiooniplasmiidide konstrueerimisel iga plasmiidi jaoks kasutatud inserdid ja vektorid (vt ka joonist 4) ning nende kogus.

Plasmiid	Vektor (pikkus, kogus)	Insert (pikkus, kogus)	Insert (pikkus, kogus)
pET-YbeY	pET-Orange vektor (4847 bp, 150 ng)	Insert 1 (524 bp, 16,2 ng)	-
pET-YbeY_H114A	pET-Orange vektor (4847 bp, 150 ng)	Insert 2 (155 bp, 9,6 ng)	Insert 3 (386 bp, 24 ng)
pET-YbeY_R59A	pET-Crimson vektor (4847 bp, 150 ng)	Insert 4 (324 bp, 20 ng)	Insert 5 (224 bp, 14 ng)

Tabel 9. PCR reaktsioonisegu koostis komplementatsiooniplasmiidide õigsuse kontrollimisel.

Koostisosa (algne kontsentratsioon)	Ruumala 50 µl reaktsiooni kohta	Lõplik kogus 50 µl reaktsioonis
Phusion HF puhver (5x)	10 µl	1x
dNTP segu (40 mM)	1 µl	0,8 mM
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	1 U
Praimer Seq_pET1 (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Praimer Seq_lacI1 (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Plasmiid	Oleneb kontsentratsioonist	10-25 ng
MQ vesi	Kuni 50 µl	

Tabel 10. PCR reaktsiooni tingimused komplementatsiooniplasmiidide õigsuse kontrollimisel.

Tsükli number	Denaturatsioon	Hübridisatsioon	Ekstensioon
1	98°C, 30 s		
2-31	98°C, 10 s	53°C, 30 s	72°C, 15 s
32			72°C, 5 min

LISA 3

LP puhver

60 mM KCl
60 mM NH₄Cl
50 mM Tris puhver pH=7,9
6 mM MgCl₂
5 mM β-merkaptopetanol (lisada 1x LP puhvrile vahetult enne kasutamist)

10x LLP puhver

250 mM Tris puhver pH=7,9
1M KCl
100 mM MgCl₂
Hoida +4°C juures.
5 mM β-merkaptopetanol (lisada 1x LLP lahusele vahetult enne kasutamist)

10x MOPS puhver

200 mM MOPS
Panna paika pH=7,0 2N NaOH abil.
50 mM naatriumatsetaat
20 mM EDTA
Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri.
Säilitada toatemperatuuril ja kaitsta valguse eest.

20x SSC lahus

3 M NaCl
0,3 mM naatriumtsitraat
Panna paika pH=7,0 HCl abil. Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri. Autoklaavida.
Säilitada toatemperatuuril.

10% SDS lahus

50 g SDS lisada 400 ml MQ veele, segada magnetsegajal, kuumutada 65°C, et see lõplikult lahustuks. Viia ruumala MQ veega 500 ml-ni. Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri. Säilitada toatemperatuuril.
PS! Kanda kaitsvat maski, et SDS mitte sisse hingata.

10x Detektsioonipuhver

30,25 g TRIS alus
29,2 g NaCl
mQ veega viia lahus 200 ml-ni.
Panna paika pH=9,5, kasutades selleks kontsentreeritud HCl. Autoklaavida ja säilitada +4°C juures.

10x TEN

1 mM EDTA
10 mM Tris (pH7)
100 mM NaCl

0,5M EDTA pH=8,0

Lisada 93,06 g EDTAd 400 ml MQ veele. Magnetsegajal segamise ajal lisada NaOH tükikesi, et viia pH-d 8-ni. Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri. Autoklaavida.
Säilitada toatemperatuuril.

Hübridisatsioonipuhver

0,5 M naatriumfosfaatpuhver pH=7,2
7% SDS

Pesupuhver

20 mM naatriumfosfaatpuhver pH=7,2
1% SDS

10x MAB puhver

1 M maleiinhape
1,5 M NaCl
400 ml MQ vesi
Panna paika pH=7,5, lisades 37 g NaOH tükikesi 2-3 osas, et vältida lahuse ülekuumenemist. Vahepeal jahutada jääl. Viia lahus lõplikult õigele pH-le, kasutades 2 N NaOH lahust. Viia lahus 500 ml-ni. Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri. Autoklaavida. Säilitada +4°C juures.

1xMAB+Tween lahus

755 ml 1x MAB lahusele lisada 2,26 ml Tween20. Hoolikalt segada.

10x Block lahus

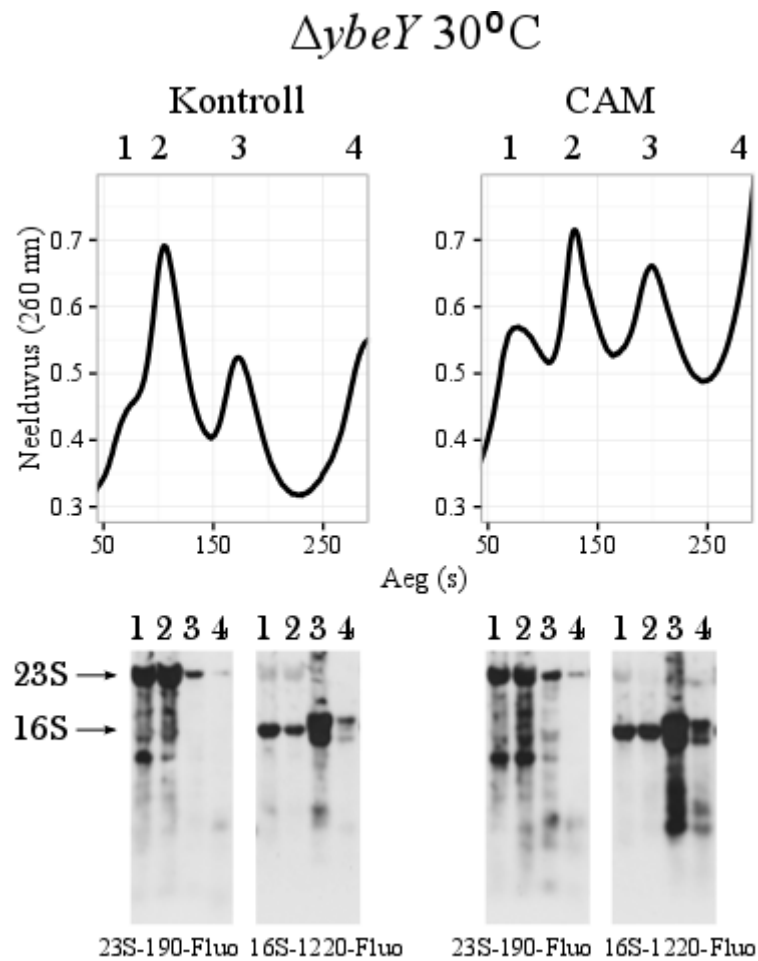
10% blokeerimisreagenti (Roche (Cat. No. 11 096 176 001)) lahustada 1x MAB puhvril. Soojendada +65°C, segada magnet-segajal. Autoklaavida, et täielikult lahustuks. Hoida 10 ml kaupa -20°C juures.

1x MAB+Block lahus

Vahetult enne kasutamist lisada 45 ml 1x MAB lahusele 5 ml sulanud Block lahust. Segada.

Puhastuslahus

5 ml 10% SDS lahust
5 ml 0,5M EDTA (pH=8)
490 ml MQ vesi



Joonis 15. $\Delta ybeY$ tüvede ribosoomide ja rRNA profiilid kontrollkultuurides ja CAM töötusel (7 $\mu\text{g/ml}$) 30°C juures LB söötmes. Rakkude lüüsimiseks kasutati MicroFluidizer EmulsiFlex C3 (Avestin) masinat. 50 A_{260} ühikut ribosoomi eraldati 10%→25% sahharoosigradiendil, RNA visualiseeriti *Northern blot* meetodil. Selleks kasutati oligonukleotiide 23S-190-Fluo ja 16S-1220-Fluo. Ribosoomi profiilide piikide numbrid vastavad rRNA profiilide fraktsioonide numbritele. Ribosoomide profiilide x-teljele on märgitud gradientide mahavõtmise aeg sekundites ning y-teljele ribosoomiosakeste neelduvus lainepikkusel 260 nm.

LIHTLITSENTS

Mina, Sille Hausenberg (sünnikuupäev: 10.05.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„YbeY valgu toimemehhanismist rRNA ja ribosoomide metabolismis *Escherichia coli*’s“,

mille juhendajad on Ülo Maiväli ja Arvi Jõers,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace’i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2016